

Institut für Molekularbiologie  
(Tumorforschung)

**Identifikation und Charakterisierung des  
Adenovirus E1A-Proteine bindenden zellulären  
Faktors r-SREC**

Inaugural-Dissertation

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.  
des Fachbereichs  
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur  
an der  
Universität Duisburg/Essen

vorgelegt von  
Silke Kullmann  
aus Essen

Oktober 2003

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) der Universität Duisburg/Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Esche

2. Gutachter: Prof. Dr. de Groot

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Pfanz

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2004

<b>I</b>	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>II</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>V</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Adenoviren	1
1.1.1	Die produktive Infektion	3
1.1.2	Die abortive Infektion	4
1.2	Die Struktur der E1A-Regionen des hoch-onkogenen Serotyps Ad12 und des nicht-onkogenen Serotyps Ad2	5
1.3	Kontrolle der Genexpression durch adenovirale E1A-Proteine	8
1.4	Transformation durch Adenoviren	10
1.5	Das onkogene Potential der E1A-Genprodukte des Adenovirus-Serotyps 12	12
1.6	Zielsetzung der Arbeit	14
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>15</b>
2.1	Chemikalien	15
2.2	Enzyme	17
2.3	Plasmide	17
2.4	Nukleinsäuren	18
2.5	Oligonukleotide	19
2.6	Antikörper	19
2.7	Medien, Reagenzien und Materialien für die Zellkultur	20
2.8	Radiochemikalien	21
2.9	Molekulargewichtsstandards	21
2.10	Kits und spezielle Reagenzien	21
2.11	Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien	22
2.12	Spezielle Laborgeräte	22
2.13	Puffer und Lösungen	23
2.14	Bakterienstämme	27
2.15	Hefestamm	27
2.16	Zelllinien	27

<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>Allgemeine Methoden</b>	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren</b>	<b>29</b>
3.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis <i>et al.</i> , 1986)	29
3.2.2	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	30
3.2.3	Isolierung der Gesamt-RNA aus Rattengeweben	30
<b>3.3</b>	<b>Protein-Protein-Interaktionsstudien mit Hilfe des Hefe „SOS-Two-Hybrid“-Systems</b>	<b>30</b>
3.3.1	Amplifikation der Rattenhypophysen-cDNA-Expressionsbank	31
3.3.2	Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen	31
3.3.3	Selektive Wachstumsbedingungen zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen im Hefe „SOS-Two-Hybrid“-System	32
3.3.4	Präparation der Plasmid-DNA aus Hefezellen	33
3.3.5	Herstellung kompetenter Hefezellen (Klebe <i>et al.</i> , 1983)	33
<b>3.4</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>34</b>
3.4.1	Transfektion eukaryontischer Zellen	34
3.4.2	Infektion von Säugerzellen mit Adenovirus (Ad12)	35
3.4.3	Etablierung stabiler Zelllinien	35
<b>3.5</b>	<b>Bestimmung der CAT-Aktivität in Zellextrakten</b>	<b>35</b>
<b>3.6</b>	<b>Hybridisierung eines Northern-Blots</b>	<b>36</b>
3.6.1	Herstellung [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP markierter DNA-Sonden	37
<b>3.7</b>	<b>Analyse von Proteinen</b>	<b>37</b>
3.7.1	Herstellung von Gesamtzell-Proteinextrakten aus Säugerzellen	37
3.7.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.7.3	Western-Blotting	38
<b>3.8</b>	<b>Protein-Protein-Interaktionsanalysen</b>	<b>38</b>
3.8.1	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen	38
3.8.2	<i>In vitro</i> Transkriptions/Translations-System	39
3.8.3	GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen	40
<b>3.9</b>	<b>Immunpräzipitationen</b>	<b>40</b>
<b>3.10</b>	<b>Immunfluoreszenzanalysen</b>	<b>41</b>

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Identifikation eines die CR2-S-CR3 des Adenovirus-Serotyps12 bindenden, zellulären Faktors mit Hilfe des Hefe „SOS-Two-Hybrid“-Systems</b>	<b>42</b>
4.1.1	Amplifikation und Charakterisierung der im Hefesystem eingesetzten Rattenhypophysen-cDNA-Expressionsbibliothek	45
4.1.2	Durchmusterung der Rattenhypophysen-cDNA-Expressionsbank auf potentielle Interaktionspartner der Region E1A <sub>Ad12</sub> -CR2-S-CR3	46
<b>4.2</b>	<b>Charakterisierung der mit Hilfe des Hefe „SOS-Two-Hybrid“-Systems identifizierten cDNA</b>	<b>50</b>
<b>4.3</b>	<b>Bestimmung der Expression und der Größe der nativen r-REC mRNA in Ratten- und Humangewebe</b>	<b>52</b>
<b>4.4</b>	<b>Identifikation der vollständigen Kodierungssequenz der r-REC cDNA</b>	<b>55</b>
<b>4.5</b>	<b>Das r-SREC-Protein interagiert mit adenoviralen E1A-Proteinen in Säugerzellen</b>	<b>60</b>
<b>4.6</b>	<b>Identifikation der für die Interaktion mit r-SREC verantwortlichen E1A-Proteindomänen</b>	<b>64</b>
<b>4.7</b>	<b>R-SREC reprimiert die E1A-vermittelte Aktivierung der Promotoren E2Ad12(140 bp) und G5-E1B TATA in transienten Expressionsstudien</b>	<b>65</b>
<b>4.8</b>	<b>Das r-SREC-Protein ist in der Zelle cytoplasmatisch lokalisiert</b>	<b>68</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>76</b>
<b>5.1</b>	<b>R-SREC interagiert mit E1A-Proteinen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i></b>	<b>76</b>
<b>5.2</b>	<b>R-SREC exprimiert ein Protein (366 AS) mit bisher unbekannter Funktion</b>	<b>79</b>
<b>5.3</b>	<b>Mögliche Funktionen der innerhalb des r-SREC-Proteins identifizierte Domänen</b>	<b>79</b>
<b>5.4</b>	<b>Das cytoplasmatisch lokalisierte r-SREC-Protein reprimiert die Ad12 E1A<sub>13S</sub>-vermittelte Transaktivierung spezifischer Promotoren</b>	<b>81</b>

---

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>Publikationen</b>	<b>96</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>97</b>
<b>10</b>	<b>Erklärungen</b>	<b>98</b>

## II Abkürzungen

A	Ampere
A.	Aqua
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
ATF-2	Activating Transcription Factor-2
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
bar	Druckeinheit
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar
Bq	Becquerel; 1 Bq = 1 Zerfall pro Sekunde
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinder Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
cAMP	zyklisches Adenosin-5'-Monophosphat
CAR	Coxsackievirus Adenovirus Rezeptor
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
CBP	Cap Binding Protein
cDNA	zur RNA komplementäre DNA
°C	Grad Celcius
Ci	Curie; 1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq
cpm	counts per minute (Radioaktive Impulse pro Minute)
CR1-CR3	Conserved Regions (konservierte Regionen der E1A-Region der Adenoviren)
CRE	cAMP-Responsive-Element
CREB	cAMP Responsive-Element Binding Protein
Da	Dalton (atomare Masseneinheit; 1 Dalton = $1,66 \times 10^{-24}$ g)
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat

DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethyl Pyrokarbonat
DHHC	Einbuchstabencode Aminosäuren
DMEM	Dulbeccos Modifikation des Mediums nach Eagle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherischia coli
E2F	Transkriptionsfaktor 2
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GAP	GTPase Activating Protein
Grb2	Growth factor receptor bound protein 2
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HEK	Human Embryo Kidney (humane embryonale Nierenzellen)
HEPES	Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure
hnRNA	heterogeneous nuclear RNA (heterogene Kern-RNA)
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl Thiogalctoside
l	Liter
LB	Luria-Bertania
LOH	Loss Of Heterozygosity
M	Molarität (mol/l)
MEK	Mitogen Activated Protein Kinase/ERK Kinase



MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
min	Minute
mol	Mol (Stoffmenge)
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MYR	Myristilisierungssignal
NP-40	Nonidet P-40
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
PIC	Preinitiation Complex
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-Buffered-Saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
pH	pH-Wert ( $\text{pH} = -\log_{10} [\text{Protonenkonzentration (mol/l)}]$ )
PKA	Proteinkinase A
pRB	Retinoblastom Protein
PS	Penicillin/Streptomycin
R	Aminosäurerest
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
REAM	Reduced Expression Associated with Metastasis
RI $\alpha$ , RII $\alpha$	Regulatorische Untereinheiten
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
r-SREC	Rat Small Reduced Expression in Cancer
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit ( $1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s}$ )
S	Spacer
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOS	Son-of-Sevenless
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Buffered-Saline (trisgepufferte Salzlösung)

TM	Transmembran-Regionen
TM	Transfektionsmedium
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzym-Aktivitätseinheit; 1 U = 1 mol/min)
V	Volt
<i>v-src</i>	Virus Sarcoma
VT	Versen-Trypsin
WCE	Whole Cell Extract
wt	Wildtyp
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung g ( $1 \times g = 9,81 \times \text{m/s}^2$ )
z. B.	zum Beispiel

In dieser Arbeit benutzte Vorsätze zur Angabe der Zehnerpotenz, mit der die Maßeinheit zu multiplizieren ist:

T	Tera	$= 10^{12}$
G	Giga	$= 10^9$
k	Kilo	$= 10^3$
c	Zenti	$= 10^{-2}$
m	Milli	$= 10^{-3}$
μ	Mikro	$= 10^{-6}$
p	Piko	$= 10^{-12}$

# 1. Einleitung

Virus-Wirtszell-Systeme stellen seit über einem viertel Jahrhundert ideale Modelle dar, um zell- und molekularbiologische Prozesse bei Eukaryonten zu untersuchen. So wurden mit Hilfe solcher Systeme wichtige Erkenntnisse über die Regulation der Genexpression, der DNA-Replikation, der Proliferation und Differenzierung sowie der Apoptose gewonnen. Zudem sind Virus-Wirtszell-Systeme, in denen sog. Tumoviren zum Einsatz kommen, für die Aufklärung der Mechanismen der malignen Transformation eukaryontischer Zellen sowie der Tumorentstehung und -progression von besonderer Bedeutung.

Da Viren weder eigene energiebildende Stoffwechselsysteme noch makromolekulare Synthesemaschinen besitzen, sind sie für ihre Vermehrung auf Wirtszellen angewiesen, in denen sie ihr Genom exprimieren, replizieren und neue Viruspartikel bilden können. DNA-Viren, wie z.B. Adenoviren, können ihr Genom nur in proliferierenden Zellen vermehren. Da in der Regel die von DNA-Viren infizierten Zellen nicht proliferieren, müssen die ersten viralen Genprodukte den Zellzyklus deregulieren und die Zelle in die Proliferation treiben, um eine effiziente Replikation des viralen Genoms zu gewährleisten. In seltenen Fällen, in denen es aus verschiedenen Gründen zu keiner Virusvermehrung in den infizierten Zellen (abortive Infektion) kommt, können die Funktionen der früh exprimierten, regulatorischen viralen Proteine die Wirtszellen onkogen transformieren. Veränderungen in der Biologie der transformierten Zellen sind hierbei auf die Funktionen der viralen Genprodukte und ihre Interaktionen mit zellulären Proteinen des makromolekularen Syntheseapparates und der zellulären Signalwege zurückzuführen.

Die funktionelle Analyse der Interaktion viraler Onkoproteine mit zellulären Faktoren nutzt man daher, um die molekularen Mechanismen der Zelle, wie die der Regulation, der Proliferation, der Differenzierung und der Apoptose besser zu verstehen.

## 1.1 Adenoviren

Adenoviren bilden taxonomisch die Familie der *Adenoviridae*, die sich in die Gattungen *Aviadenovirus* (Vogel-Adenovirus) und *Mastadenovirus* (Säuger-Adenovirus) gliedert (Norrbj *et al.*, 1976). Humanpathogene Adenoviren (Ad) wurden erstmals 1953 von W. Rowe und Mitarbeitern aus chirurgisch entfernten Tonsillen von Patienten mit Erkrankungen des respiratorischen Traktes isoliert und in Kultur vermehrt (Rowe *et al.*, 1953). Adenovirale Infektionen verursachen beim Menschen neben leichten

Atemwegserkrankungen auch solche des Gastrointestinaltraktes, der Harnwege oder der Bindehaut des Auges (als Übersicht siehe Horwitz, 1990). Heute sind über 45 humanpathogene Adenovirus-Serotypen beschrieben, die aufgrund unterschiedlicher Kriterien, wie DNA-Sequenzhomologien, dem Muster des Restriktionsendonukleaseverdaus des viralen Genoms, Haemagglutinations-Reaktionen mit Ratten- und Resusaffenerythrozyten, dem Ausmaß ihrer Onkogenität in Nagern und der Polypeptid-Zusammensetzung des Virions in sechs Subgenera (A-F) eingeteilt werden (als Übersicht siehe Bailey und Mautner, 1994).

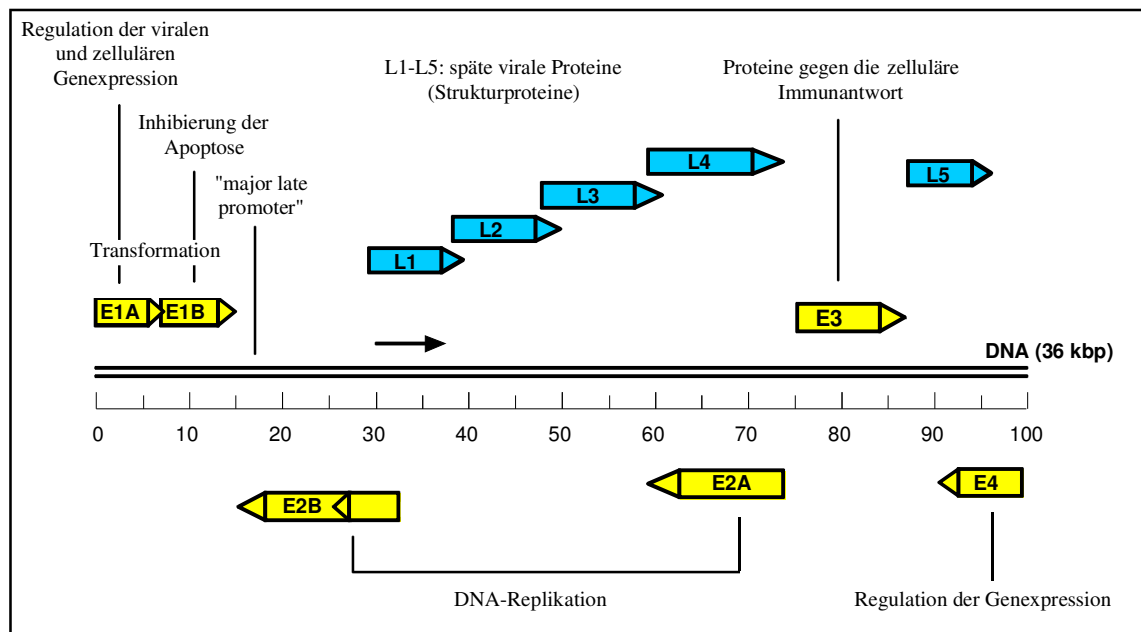
Adenoviren, die zur Familie der DNA-Tumoviren gehören, besitzen eine lineare, doppelsträngige DNA in der Größe von 36-38 kbp, die mit viruskodierten basischen Proteinen assoziiert und von einer icosaedrischen Proteinhülle mit einem Durchmesser von 70-90 nm umgeben ist (als Übersicht siehe Flint und Broker, 1981). Eine Lipid-Hüllmembran ist nicht vorhanden. Das Capsid ist aus 252 Untereinheiten (Capsomeren) aufgebaut, wobei durch die geometrische Anordnung zwischen 240 Hexacapsomeren und 12 Pentoncapsomeren unterschieden wird (als Übersicht siehe Philipson, 1983). Jedes Pentoncapsomer trägt ein Fiber-Protein, das durch die Pentoncapsomerbasis an der Oberfläche verankert ist. Diese Fiber-Proteine vermitteln die Adsorption des Virus an spezifische Rezeptoren der Wirtszelle (Londberg-Holm und Philipson, 1969). Die meisten Adenovirus-Serotypen nutzen den Cocksackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR), eine Komponente der sog. „tight junctions“ (Cohen *et al.*, 2001), zur Adsorption an die Zelloberfläche (Roelvink *et al.*, 1998). Die Penton-Proteine interagieren mit einem Korezeptor der  $\alpha$ V-Integrin-Familie. Diese Interaktion bewirkt die Abstoßung der Fiber-Proteine und den Einschluss des Virions über Clathrin-reiche Regionen in die Endosomen (als Übersicht siehe Cullan, 2001). Nach Freisetzung aus den Endosomen und unter Verlust der Pentoncapsomere gelangt das Virus in das Cytoplasma der Zelle, wo es, vermutlich über Bindung der Hexoncapsomere entlang der Mikrotubuli, zu den Kernporen transportiert wird (Pastan *et al.*, 1987). Nach Erreichen der Kernporen und dem Zerfall der Virushülle wird die virale DNA in den Zellkern importiert (Greber *et al.*, 1997).

Humanpathogene Adenoviren sind in der Lage, Zellen aus verschiedenen Spezies zu infizieren. In Abhängigkeit von der Spezies, von der die Zielzelle stammt, gibt es zwei mögliche Formen des Infektionsverlaufs: die **produktive Infektion** permissiver Zellen (z.B. humaner Zellen) und die **abortive Infektion** nicht-permissiver Zellen (z.B. Nagerzellen).

### 1.1.1 Die produktive Infektion

Die produktive Infektion permissiver menschlicher Zellen durch humanpathogene Adenoviren führt zur viralen DNA-Replikation und zur Produktion von Virusnachkommen. Nach Eintritt in den Zellkern erfolgt die Expression des Virusgenoms und die Replikation der viralen DNA. Die Expression der viralen Gene wird, gemäß dem Zeitpunkt der Transkription, in zwei zeitliche Abschnitte eingeteilt (Broker *et al.*, 1984; siehe **Abb. 1**): die Expression der sog. frühen Gene (Regionen E1A, E1B, E2A, E2B, E3, E4) beginnt ca. 3-5 Stunden nach der Infektion der Wirtszelle. Diese frühen Gene kodieren für Proteine, die vor allem in die Regulation der viralen und zellulären Genexpression und die Replikation der viralen DNA involviert sind. Nach Beginn der viralen DNA-Replikation (ca. 10-12 Stunden nach der Infektion) werden zusätzlich die sog. späten Gene (Regionen L1-L5) exprimiert, die für virale Struktur-Proteine und Enzyme kodieren, die für die Bildung der Viruspartikel notwendig sind.

Die adenovirale E1A-Region kodiert für Proteine, deren Funktionen für die Expression aller anderen viralen Gene essentiell sind und zudem die Expression spezifischer zellulärer Gene modulieren (als Übersicht siehe Brockmann und Esche, 1995; Gallimore und Turnell, 2001). Letztere Funktion führt dazu, dass infizierte Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Infektion in der G<sub>0</sub>-Phase des Zellzyklus befinden, in den Zellzyklus eintreten und proliferieren. Die E1B-Region kodiert für zwei Proteine (19 kDa, 55 kDa), die für die Akkumulation, Stabilisierung und Translation viraler mRNAs verantwortlich sind (Pilder *et al.*, 1986; Zhang *et al.*, 1995; Gabler *et al.*, 1998) und gleichzeitig die E1A-induzierte Apoptose inhibieren (als Übersicht siehe White, 1995). Die E2-Region kodiert für Proteine, die direkt an der DNA-Replikation beteiligt sind. Hierzu gehören eine virale DNA-Polymerase, ein Einzelstrang-DNA-Bindeprotein und das sog. terminale Protein (Bellet-Protein), das über ein Phosphoserin kovalent an das 3'-Ende der viralen DNA gebunden ist und für die Initiation der an den Enden beginnenden sog. „Displacement-DNA-Replikation“ essentiell ist (Sussenbach und van der Vliet, 1983). Die Genprodukte der E3-Region reprimieren die Immunantwort des Wirtsorganismus. So wird z.B. die Translokation der MHC-Klasse-I Moleküle an die Zellmembran (Burgert *et al.*, 1987) oder die TNF-vermittelte Zelllyse (Gooding *et al.*, 1988) verhindert. Die Transkriptionseinheit E4 kodiert für Proteine, die in Kooperation mit viralen (E1A, E1B) und zellulären Faktoren (z.B. E2F) an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Zudem sind die Genprodukte der Region E4 essentiell für das Spleißen viraler hnRNAs sowie für den Transport der viralen mRNA in das Cytoplasma (als Übersicht siehe Shenk, 1996).



**Abb. 1** Schematische Darstellung der Genomorganisation humanpathogener Adenoviren (nach Watson *et al.*, 1987). Das lineare doppelsträngige DNA-Molekül der Adenoviren wird in „map units“ (1-100) unterteilt. Bei den Adenovirus-Transkriptionseinheiten werden frühe (E = early; E1-E4) und späte (L = late; L1-L5) Regionen unterschieden. Die Regionen E1-E4 werden jeweils durch einen eigenen Promoter reguliert, die späten Regionen L1-L5 stehen unter der Kontrolle eines einzigen Promoters („major late promoter“). Zentrale Funktionen der jeweiligen Genprodukte sind angegeben.

Nach Beginn der Virus-DNA-Replikation, etwa 10-12 Stunden nach der Infektion, beginnt die Expression der späten viralen Gene, die unter der Kontrolle des „major late promoters“ stehen (Evans *et al.*, 1977; Nevins und Darnell, 1978; siehe **Abb. 1**). Während der späten Phase der Infektion werden durch alternatives Spleißen einer nukleären Vorläufer-RNA mindestens 20 verschiedene mRNAs prozessiert, die in fünf Gruppen (L1-L5) eingeteilt werden und für Strukturproteine des Virions (z.B. Capsomere, Fiber) oder deren Vorläufer kodieren (als Übersicht siehe Flint und Broker, 1981). Diese werden in den Zellkern transportiert, wo anschließend der Zusammenbau infektiöser Virionen stattfindet (Horwitz *et al.*, 1969). Die produktive Infektion endet mit der Lyse der Zelle und der Freisetzung infektiöser Virionen (Tooze, 1981).

### 1.1.2 Die abortive Infektion

Bei der Infektion nicht-permissiver Zellen (z.B. Nagerzellen) durchlaufen humanpathogene Adenoviren einen abortiven Zyklus, in dessen Verlauf keine neuen infektiösen Viruspartikel gebildet werden (Doerfler, 1969). Die Infektion nicht-permissiver Zellen und die Expression der frühen viralen Gene verläuft in den ersten Schritten analog zur produktiven Infektion, die

virale DNA-Replikation und/oder die Expression der späten Regionen findet jedoch nicht statt (Esche *et al.*, 1979; Esche und Siegmann, 1982).

Bei der abortiven Infektion kommt es, wie bei der produktiven Infektion, zu einer partiellen Integration des viralen Genoms in das Genom der Wirtszelle. Die konstitutive Expression der in das Zellgenom integrierten frühen viralen Gene der Regionen E1A und E1B kann bei der abortiven Infektion in  $1 \times 10^{-6}$  bis  $1 \times 10^{-5}$  Fällen zur einer Transformation der infizierten, nicht-permissiven Zellen führen (van der Eb und Bernards, 1984).

Werden *in vitro* transformierte Zellen in immundefiziente Nager (z.B. Nacktmäuse) inokuliert, wachsen sie zu Tumoren aus. Alle humanpathogenen Ad-Serotypen sind dabei in der Lage, in immundefizienten Nagern ein Tumorstadium zu induzieren. Tumorstadium in immunkompetenten Nagern wird jedoch nur induziert, wenn die Zellen durch einen onkogenen Adenovirus-Serotypen transformiert wurden (als Übersicht siehe Williams *et al.*, 1995). In Bezug auf die unterschiedliche Onkogenität in immunkompetenten Nagern können daher onkogene (z.B. Ad12, Ad18, Ad31) und nicht-onkogene (z.B. Ad2, Ad5) Adenovirus-Serotypen unterschieden werden (Wadell, 1984). Mutationsanalysen mit chimären Adenoviren (Ad12/Ad2) haben gezeigt, dass das tumorigene Potential der verschiedenen Ad-Serotypen ausschließlich durch die Funktionen der E1A-Genprodukte bestimmt wird (Bernards *et al.*, 1983). Daher muss man davon ausgehen, dass die E1A-Genprodukte der onkogenen und nicht-onkogenen Adenovirus-Serotypen neben einer Reihe von gemeinsamen Funktionen auch einige funktionelle Unterschiede aufweisen, die für das unterschiedliche onkogene Potential verantwortlich sind.

Das Adenovirus-Wirtszell-System ist somit ein ideales Modellsystem, um durch vergleichende Analysen zelluläre Prozesse aufzuklären, die an der Virus-induzierten Transformation sowie der Tumorentstehung in immundefizienten und immunkompetenten Tieren beteiligt sind.

## **1.2 Die Struktur der E1A-Regionen des hoch-onkogenen Serotyps Ad12 und des nicht-onkogenen Serotyps Ad2**

Die adenovirale E1A-Region, die am äußersten linken Ende des Adenovirus-Genoms lokalisiert ist, ist die erste Transkriptionseinheit, die nach der Infektion der Wirtszelle exprimiert wird. Durch alternatives Spleißen der viralen hnRNA der E1A-Region werden bei dem hoch-onkogenen Serotyp Ad12 sechs verschiedene mRNAs (gemäß ihren Sedimentationskoeffizienten als 13S, 12S, 11S, 10S, 9,5S und 9S bezeichnet) generiert

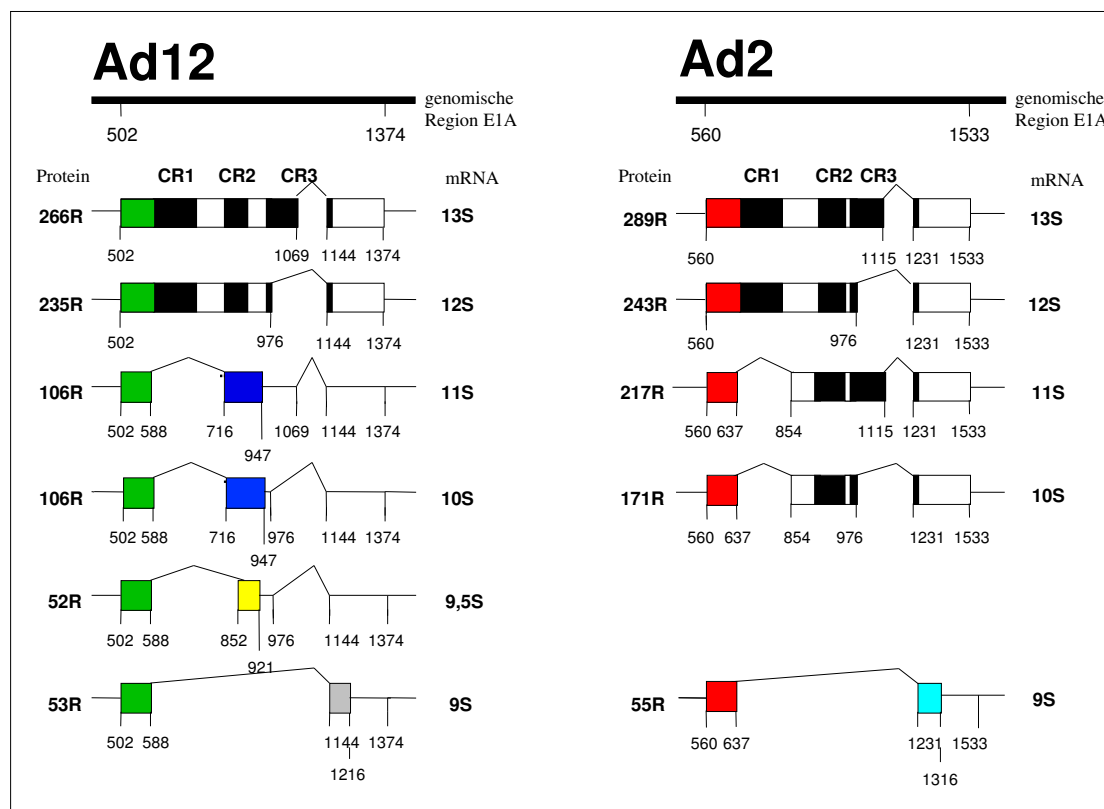
(Brockmann *et al.*, 1990; siehe **Abb. 2**). Alle mRNAs weisen die gleichen 5'- und 3'-Termini auf, unterscheiden sich jedoch in ihrer Größe, da unterschiedlich große Introns während der Prozessierung der hnRNA eliminiert werden. Von den mRNAs werden fünf unterschiedliche Proteine (266R, 235R, 106R, 52R, 53R) translatiert. Die beiden dominant vorkommenden Proteine während der frühen viralen Infektion sind das 266R-Protein (generiert von der 13S mRNA, im Folgenden als Ad12 E1A<sub>13S</sub> bezeichnet) und das 235R-Protein (generiert von der 12S mRNA, im Folgenden als Ad12 E1A<sub>12S</sub> bezeichnet). Beide Proteine besitzen den gleichen Leseraster, unterscheiden sich jedoch infolge des alternativen Spleißens durch den Wegfall einer internen, Cystein-reichen Region von 31 Aminosäuren innerhalb des 235R Proteins (Brockmann und Esche, 1995). Dieses Segment entspricht der konservierten Region 3 des 266R E1A-Proteins und repräsentiert eine von drei E1A-Regionen (konservierte Regionen 1-3; CR1, CR2, CR3), die in allen Adenovirus-Serotypen hoch konserviert sind (Kimelmann *et al.*, 1985) und als funktionelle Domänen fungieren (als Übersicht siehe Brockmann und Esche, 1995).

Im Gegensatz zu den entsprechenden Proteinen der E1A-Region des nicht-onkogenen Adenovirus-Serotyps 2 enthalten die 266R und 235R Proteine des onkogenen Adenovirus-Serotyps 12 eine sog. Spacer-Region, eine 20 Aminosäuren umfassende Sequenz, die zwischen den konservierten Regionen 2 und 3 liegt. Die Funktion dieser Region ist noch weitgehend unbekannt. Durch den Einsatz von Spacer-Mutanten konnte diese Region in Tierversuchen jedoch als eine der onkogenen Determinanten identifiziert werden (Jelinek *et al.*, 1994; Telling und Williams, 1994).

Durch die Eliminierung jeweils zweier Introns aus dem primären Transkript werden die 11S und die 10S mRNA generiert. Das Startkodon (nt 502) der beiden kodierten Proteine entspricht dem des 266R und des 235R Proteins. Es kommt jedoch zu einer Leserasterverschiebung mit Beginn des zweiten Exons (Aminosäure 29) und einem daraus resultierenden Stopkodon an Position nt 949, wodurch von beiden mRNAs das gleiche Protein (106R) translatiert wird. Bei der 9,5S mRNA (translatiert das 52R Protein) und der 9S mRNA (translatiert das 53R Protein) kommt es ebenfalls infolge von Spleißvorgängen zu einer Verschiebung der Leseraster nach Aminosäure 29. Die 106R, 52R und 53R Proteine besitzen aufgrund der Spleißereignisse und der daraus resultierenden Leserasterverschiebungen keine der konservierten Regionen. Außer dem N-terminalen Bereich weisen sie keine Sequenzhomologien zu dem 266R und dem 235R Protein auf (Brockmann und Esche, 1995).



Im Falle der E1A-Region des nicht-onkogenen Serotyps Ad2 führt alternatives Spleißen der hnRNA zur Bildung von fünf verschiedenen mRNAs (13S, 12S, 11S, 10S, 9S; siehe **Abb. 2**). Diese mRNAs kodieren für fünf Proteine mit 289 (13S mRNA), 243 (12S mRNA), 217 (11S mRNA), 171 (10S mRNA) und 55 (9S mRNA) Aminosäuren. Es kommt hier jedoch nur bei dem 55R Protein zu einer Leserasterverschiebung. Die übrigen Proteine besitzen den gleichen Leserahmen und unterscheiden sich nur durch den spleißbedingten Wegfall einzelner konservierter Regionen (Stephens und Harlow, 1987; Ulfendahl *et al.*, 1987).



**Abb. 2 Struktureller Vergleich der mRNAs und Proteine der E1A-Regionen des hoch-onkogenen Serotyps Ad12 und des nicht-onkogenen Serotyps Ad2 (nach Brockmann und Esche, 1995).** Die Rechtecke repräsentieren die von den verschiedenen mRNAs translatierten Proteine. Schwarze Rechtecke repräsentieren die konservierten Regionen 1-3 (CR1-CR3). Die Zahlen unter den Linien beschreiben die Positionen der jeweiligen Nukleotide und geben das Startkodon, die Spleißstellen und das Stopkodon wieder. Unterschiedliche Leseraster innerhalb eines Serotyps sind durch farbige Rechtecke gekennzeichnet. Die Spacer-Region liegt zwischen CR2 und CR3 des 266R und des 235R Proteins des Serotyps Ad12. (R) Aminosäurerest; (S) Svedberg-Einheit.

### 1.3 Kontrolle der Genexpression durch adenovirale E1A-Proteine

Ad E1A-Proteine stellen potente Transkriptionsfaktoren dar, die für die Expression aller anderen adenoviralen Transkriptionseinheiten (E1B, E2, E3, E4 und L1-L5) essentiell sind (Berk, 1986). Zudem regulieren sie die Expression spezifischer zellulärer Gene sowohl positiv (z.B. c-Jun, c-Myc und  $\beta$ -Tubulin) als auch negativ (z.B. Insulin und Kollagen) (als Übersicht siehe Brockmann und Esche, 1995). Die genregulatorischen Funktionen der E1A-Proteine werden hauptsächlich durch die konservierten Regionen CR1, CR2 und CR3 sowie den nicht-konservierten N-Terminus vermittelt.

Im Gegensatz zu klassischen Transkriptionsfaktoren besitzen E1A-Proteine keine intrinsische DNA-Bindeaktivität (Ferguson *et al.*, 1985; Zu *et al.*, 1992), sondern vermitteln ihre transregulatorischen Funktionen über Protein-Protein-Interaktionen mit zellulären Faktoren (siehe **Abb. 3**). Diese zellulären Faktoren können in folgende Klassen eingeteilt werden:

#### (1) *Generelle Transkriptionsfaktoren und Mediatoren*

E1A-Proteine interagieren mit einer Vielzahl genereller Transkriptionsfaktoren, wodurch die virale Genexpression in der infizierten Zelle effizient reguliert wird. So wurde u.a. gezeigt, dass die CR3 des E1A<sub>13S</sub>-Proteins, die selber als Zinkfinger-Transaktivierungsdomäne fungiert, Untereinheiten des TF<sub>II</sub>D-Komplexes, wie TBP und TAFs bindet (Brockmann und Esche, 1995; Jones 1995). Der N-Terminus der E1A-Region des Serotyps Ad12 interagiert zudem mit der TF<sub>II</sub>F-Untereinheit RAP30 (Lipinski *et al.*, 1998). Durch die Interaktionen mit Komponenten der TF<sub>II</sub>D- und TF<sub>II</sub>F-Komplexe trägt E1A höchstwahrscheinlich zur Stabilisierung des sog. „preinitiation complex“ (PIC) bei.

Neben der Bindung an generelle Transkriptionsfaktoren ist die Interaktion der CR3-Domäne mit dem humanen hSrb/Mediator-Komplex über dessen hSur-2-Untereinheit im Prozess der E1A<sub>13S</sub>-vermittelten Aktivierung von Zielgenen von Bedeutung (Boyer *et al.*, 1999).

#### (2) *DNA-sequenzspezifisch-bindende Transkriptionsfaktoren*

DNA-bindende Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-Jun und ATF-2, fungieren als Adaptoren für E1A-Proteine im Promotor von Zielgenen (Liu und Green, 1990; Duyndam *et al.*, 1996). Diese, über die CR3 der adenoviralen E1A-Region vermittelte Interaktion bewirkt eine transkriptionelle Aktivierung des Zielgens. Die

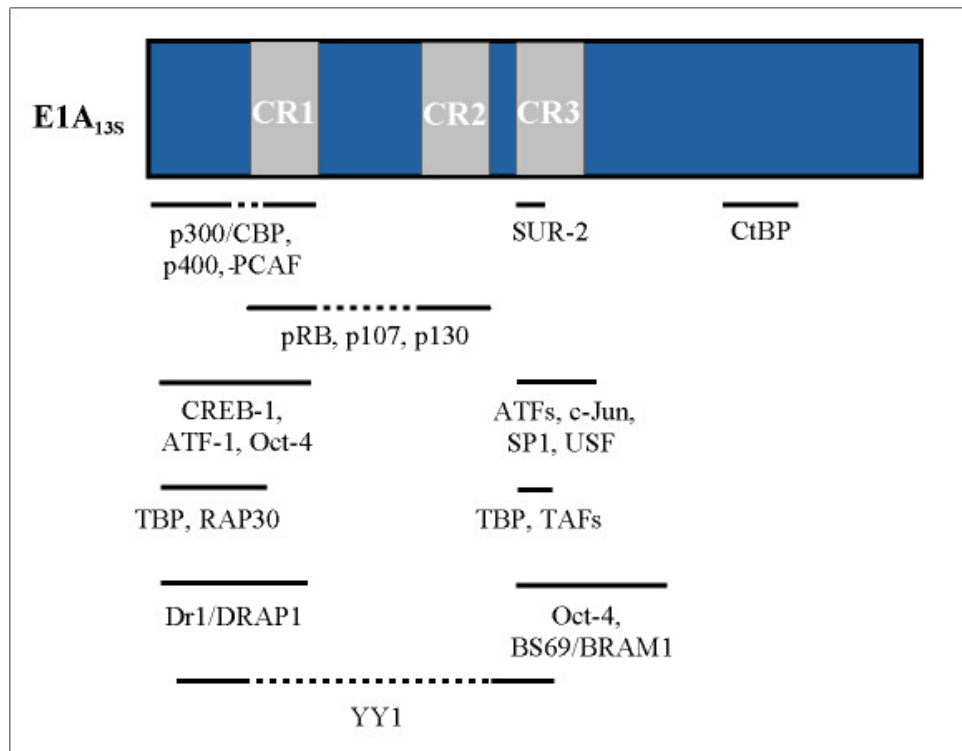
Rekrutierung des E1A<sub>13S</sub>- oder des E1A<sub>12S</sub>-Proteins an promotorgebundene c-Jun/ATF-2-Transkriptionsfaktorkomplexe führt z.B. zu einer Aktivierung des c-Jun-Promotors (Duyndam *et al.*, 1996). Das c-Jun-Protein ist in verschiedene zelluläre Prozesse, wie die Differenzierung und die Proliferation involviert (Angel und Karin, 1991). Man vermutet, dass die Expression dieses Proteins durch die adenoviralen E1A-Proteine im produktiven Entwicklungszyklus essenziell ist, da c-Jun in Signalkaskaden involviert ist, die arretierte Zellen in den Zellzyklus zurückführen.

(3) *Repressoren von DNA-sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren*

Die E1A-Genprodukte interagieren mit Repressoren von DNA-sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren. Hierzu zählt z.B. das Retinoblastom-Protein pRB, das als Inhibitor für sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie fungiert und somit einen wichtigen Faktor der Zellzyklusregulation darstellt (als Übersicht siehe Adams und Kaelin, 1998). Die E2F-Transkriptionsfaktoren sind für die Aktivierung zellulärer, proliferationsrelevanter Gene verantwortlich (Slansky und Farnham, 1996). Die Interaktion mit E1A-Proteinen, die hauptsächlich über CR2 vermittelt wird, wohingegen CR1 offenbar zur Stabilisierung dieser Interaktion beiträgt, mit dem pRB-Protein bewirkt die Dissoziation der inhibitorischen E2F/pRB-Komplexe. Hierbei wird transkriptionsaktives E2F freigesetzt (Ikeda und Nevins, 1993). Dies führt zu einer transkriptionellen Aktivierung E2F-abhängiger Gene (z.B. Dihydrofolatreduktase (DHFR) oder Thymidinkinase).

(4) *Zelluläre Koaktivatoren*

Durch zelluläre Koaktivatoren, wie z.B. p300/CBP wird der Kontakt zwischen DNA-sequenzspezifisch-bindenden Transkriptionsfaktoren und Faktoren der basalen Transkriptionsmaschinerie vermittelt (als Übersicht siehe Janknecht und Hunter, 1996). Der Aminoterminus des E1A<sub>12S</sub>-Proteins interagiert in Kooperation mit dem carboxyterminalen Ende der CR1-Domäne mit den zellulären Koaktivatoren p300/CBP. Diese Interaktion führt zur Dissoziation von p300/CBP von DNA-gebundenen Transkriptionsfaktorkomplexen und damit zur Repression des Zielgens. So wird z.B. die Transkription p53-abhängiger Zielgene unterdrückt (Avantaggiati *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997; siehe auch **Kap. 1.4**).



**Abb. 3 Interaktion zellulärer Faktoren mit dem Ad12 E1A<sub>13S</sub>-Protein (nach Brockmann *et al.*, 2001).** Die grauen Rechtecke repräsentieren die konservierten Regionen 1 bis 3 (CR1-CR3) des E1A<sub>13S</sub>-Proteins. Einige der bis heute bekannten E1A-bindenden zellulären Faktoren sind dargestellt. Die Interaktionsbereiche sind durch Linien gekennzeichnet.

## 1.4 Transformation durch Adenoviren

Wie bereits beschrieben, sind alle bis heute bekannten humanpathogenen Adenovirus-Serotypen in der Lage, primäre Zellen in Kultur zu transformieren und ein Tumorwachstum in immundefizienten Nagern (z.B. Nacktmäusen) zu induzieren (als Übersicht siehe Williams *et al.*, 1995; siehe auch **Kap. 1.1.2**). Die zelluläre Transformation erfolgt durch die konstitutive Expression der Regionen E1A und E1B. Durch Funktionen der E1A-Genprodukte werden die Zellen zunächst immortalisiert (Houweling *et al.*, 1980; Ruley, 1983). Die Genprodukte der E1B-Region haben selber keine transformierenden Eigenschaften (van den Elsen *et al.*, 1983), sind jedoch zur Ausbildung des vollständig transformierten Phänotyps essentiell. Merkmale einer vollständigen Transformation sind z.B. die Aufhebung der Kontaktinhibition und der Verankerungsabhängigkeit sowie die morphologische Umgestaltung der Zelle (Jochemsen *et al.*, 1982; Byrd *et al.*, 1988). Eine weitere wichtige Funktion der E1B-Genprodukte während des Transformationsprozesses ist die Inhibierung der durch E1A-Genprodukte induzierten Apoptose (als Übersicht siehe White, 1995).

Die für die E1A-vermittelte Transformation und die Regulation der zellulären Proliferation verantwortlichen Domänen sind im N-Terminus und in den konservierten Regionen 1 und 2 der E1A-Proteine lokalisiert. Diese funktionellen Domänen vermitteln die Interaktion mit zellulären Faktoren, wie z.B. dem pRB-Protein und dem nukleären Phosphoprotein p300/CBP (siehe **Abb. 3**), die maßgeblich an der Regulation des Zellzyklus und der Zellproliferation beteiligt sind.

Die Interaktion der E1A-Proteine mit pRB spielt eine wesentliche Rolle bei der Immortalisierung und der Transformation primärer Zellen. Das pRB-Protein bindet während der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus an verschiedene proliferationsaktivierende Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, die durch diese Bindung in ihrer transkriptionsaktivierenden Funktion inhibiert werden. Die Interaktion mit E1A-Proteinen, unter Beteiligung der Domänen CR1 und CR2 bewirkt eine Freisetzung der E2F-Transkriptionsfaktoren aus diesen inhibitorischen Komplexen (Whyte *et al.*, 1988A). Freigesetzte aktive Faktoren der E2F-Familie tragen zur Aktivierung zahlreicher, für das Durchlaufen der S-Phase notwendiger Gene, wie z.B. der Dihydrofolatreduktase und der Thymidinkinase, bei (Moran, 1994; Slansky und Farnham, 1996; als Übersicht siehe Zhang und Dean, 2001).

Die Interaktion der E1A-Proteine Ad E1A<sub>13S</sub> und Ad E1A<sub>12S</sub>, unter Beteiligung des N-Terminus und der CR1-Domäne, mit p300/CBP ist für die Immortalisierung und die Transformation primärer Zellen von entscheidender Bedeutung (Wang *et al.*, 1993). Durch diese Interaktion werden p300/CBP aus Transkriptionsfaktorkomplexen dissoziiert, wodurch u.a. die Transkription p53-abhängiger Zielgene unterdrückt wird (Avantaggiati *et al.*, 1997; Lill *et al.*, 1997; Gu *et al.*, 1997). Die Aktivierung verschiedener Gene durch p53 führt normalerweise zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G<sub>1</sub>-Phase oder zur zellulären Apoptose (als Übersicht siehe Adams und Kaelin, 1998). Die Dissoziation der Koaktivatoren p300/CBP durch die E1A-Proteine und die daraus resultierende Repression p53-abhängiger Zielgene hebt diese Arretierung in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus auf und führt demzufolge zu einer Induktion der Proliferation. In Transformationsstudien wurde gezeigt, dass sich die Überexpression von p300/CBP inhibierend auf die Transformation durch E1A-Proteine auswirkt (Smits *et al.*, 1996).

## 1.5 Das onkogene Potential der E1A-Genprodukte des Adenovirus-Serotyps 12

Die Inokulation Adenovirus-transformierter Zellen führt in immundefizienten Nagern zu der Ausbildung von Tumoren. Tumorwachstum in immunkompetenten Nagern wird jedoch nur induziert, wenn die Zellen durch einen onkogenen Adenovirus-Serotypen transformiert wurden (als Übersicht siehe Williams *et al.*, 1995). Welche Ursachen dieser unterschiedlichen Onkogenität der einzelnen Ad-Serotypen zugrunde liegen, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Jedoch haben Mutationsanalysen mit Ad12/Ad2 E1A-Chimären gezeigt, dass die Fähigkeit, Tumorwachstum in immunkompetenten Tieren zu erzeugen, von der Herkunft der Genprodukte der E1A-Transkriptionseinheit abhängig ist (Bernards *et al.*, 1983). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die E1A-Regionen onkogener und nicht-onkogener Adenovirus-Serotypen bei der Transformation primärer Nagerzellen in ihrer Transformationseffizienz unterscheiden. Somit kann man annehmen, dass Unterschiede in der Struktur der E1A-Genprodukte der onkogenen und nicht-onkogenen Adenovirus-Serotypen für das unterschiedliche onkogene Potential verantwortlich sind.

Als wichtige Unterschiede zwischen der E1A-Region der onkogenen und nicht-onkogenen Adenovirus-Serotypen sind hier **(1)** die Ad12 E1A-spezifischen Proteine E1A<sub>10S/11S</sub> und E1A<sub>9,5S</sub>, **(2)** der nicht-konservierte N-Terminus sowie **(3)** eine nicht-konservierte Region zwischen CR2 und CR3, die sog. Spacer-Region, die in unterschiedlicher Länge nur in onkogenen Ad-Serotypen zu finden ist, hervorzuheben. Die Länge dieser Spacer-Region korreliert mit dem Ausmaß der Onkogenität der Viren (Williams *et al.*, 1995; siehe **Abb. 4**).

<b>Ad5:</b>	DLTCHEAGFPPSDDDEEE-----GEEFVLDYVEHPG	<b>(n)</b>
<b>Ad3:</b>	DLRCYEEGFPPSDDDEDGTEEQSI----HT-----AVNEGVKAASDVFKLDCPELPG	<b>(s)</b>
<b>Ad12:</b>	DLLCYEMGFPCSDSEDEQDENGMAHVSAS-----AAAAAADREREERFQLDHPPELPG	<b>(h)</b>
<b>SA7:</b>	DLFCYEDGFPPSDSEEGEHSQVETERKMAEAAAAGAAAAARREQDDFRLDCPSVPG	<b>(h)</b>

**Abb. 4 Vergleich der Spacer-Regionen und der angrenzenden Bereiche verschiedener Adenovirus-Serotypen (nach Williams *et al.*, 1995).** (n) nicht-onkogener Serotyp (Ad5); (s) schwach-onkogener Serotyp (Ad3); (h) hoch-onkogener Serotyp (Ad12, SA7).

Die molekulare Funktion der Spacer-Region ist bis heute nicht geklärt. Jedoch zeigten Experimente von Williams und Mitarbeitern, dass diese Region für die onkogene Transformation von Zellen durch Adenoviren von Bedeutung ist (Williams *et al.*, 1995). Chimäre Adenoviren, in denen die Spacer-Region des hoch-onkogenen Serotyps Ad12 gegen die korrespondierende Region des nicht-onkogenen Serotyps Ad5 ersetzt wurde, zeigten in diesen Studien eine deutlich verringerte Onkogenität, woraus man schließen kann, dass der Bereich des Spacers eine wichtige onkogene Determinante darstellt.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl die Struktur und Expression der E1A-Genprodukte des hoch-onkogenen Serotyps Ad12 sowie der nicht-onkogenen Serotypen Ad2 und Ad5 weitgehend aufgeklärt und ihre Funktionen gut untersucht sind, gibt es zu den Funktionen einzelner Proteindomänen noch eine Reihe offener Fragen. Bis heute weiß man z.B. wenig über die Funktionen der Spacer-Sequenz der E1A-Region der onkogenen Ad-Serotypen, außer, dass sie für das onkogene Potential der Adenoviren von Bedeutung ist. Mögliche zelluläre Proteine, die an die Spacer-Region binden, sind zur Zeit nicht bekannt.

Zu Beginn meiner Untersuchungen waren zahlreiche zelluläre Faktoren beschrieben, die mit den konservierten Regionen (CR1-CR3) und dem Aminoterminal der E1A-Proteine interagieren, jedoch kann angenommen werden, dass bis heute nicht alle mit E1A-Genprodukten interagierenden Proteine detektiert wurden. Die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung weiterer, noch unbekannter E1A-bindender zellulärer Faktoren ist von besonderem Interesse, da hierdurch möglicherweise neue Erkenntnisse in Bezug auf die durch E1A-Proteine vermittelten Funktionen gewonnen werden könnten.

Ziel meiner Arbeit war es daher, noch unbekannte zelluläre Faktoren, die spezifisch mit CR2, der Spacer-Region und/oder CR3 der Ad12 E1A-Region interagieren, zu isolieren und, wenn möglich, funktionell zu charakterisieren.

Die Identifikation solcher E1A-bindender zellulärer Proteine sollte durch Durchmusterung einer cDNA-Expressionsbibliothek mit Hilfe eines modifizierten Hefe „Two-Hybrid“-Systems („SOS-Two-Hybrid“-System) erfolgen. Die Bestätigung dieser Interaktion in Säugerzellen (Immunpräzipitation) sollte erste Hinweise auf eine mögliche physiologische Relevanz im Hinblick auf die Bindung der E1A-Proteine mit den identifizierten zellulären Faktoren geben. Durch *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien (GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen) mit E1Awt-Proteinen und E1A-Proteinmutanten sollten die für die Bindung verantwortlichen E1A-Interaktionsdomänen bestimmt werden. Weiterhin sollten die identifizierten Faktoren in Bezug auf ihre Struktur (Aminosäure- und Domänen-Struktur), ihre Expression auf Protein- und mRNA-Ebene und ihre Expression in verschiedenen Geweben charakterisiert werden. Erste Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion der Proteine sollten durch die Bestimmung der zellulären Lokalisation sowie durch die Analyse ihres Einflusses in den E1A-vermittelten Transaktivierungsprozess spezifischer Promotoren gezogen werden (transiente Expressionsstudien).



## 2. Material

Hier nicht gesondert aufgeführte Chemikalien (mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“) sowie nicht erwähnter allgemeiner Laborbedarf wurden von unterschiedlichen Herstellern bezogen.

### 2.1 Chemikalien

Acetyl-CoA (Coenzym A)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Acrylamid	BioRad, München
Agarose	FMC Bioproducts, Dänemark, über Biozym, Hameln
Ampicillin	Bayer, Leverkusen
Ammoniumpersulfat	Sigma, Deisenhofen
Amplify	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Bacto yeast extract	Difco, Detroit, USA
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Peptone	Difco, Detroit, USA
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, USA
Bicine	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma, Deisenhofen
CSM (Complete Supplement Mixture)	Bio 101, über Serva, Heidelberg
Desoxyribonukleotide	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Fluka, Neu-Ulm
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Deisenhofen
EDTA	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Ethylacetat	Fluka, Neu-Ulm
Galactose	Difco, Detroit, USA

Glucose	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Fluka, Neu-Ulm
HEPES (Hydroxyethylpiperazinethansulfonsäure)	Sigma, Deisenhofen
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid)	Biomol, Hamburg
N,N'-Methylen-bisacrylamid	Sigma, Deisenhofen
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, München
Natriumfluorid	Sigma, Deisenhofen
Natriumorthovanadat	Sigma, Deisenhofen
NP-40	Fluka, Neu-Ulm
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Pefabloc	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1)	Fluka, Neu-Ulm
Polyethylenglycol (PEG) 1000	Merck, Darmstadt
Raffinose	Difco, Detroit, USA
D-Sorbitol	Sigma, Deisenhofen
TEMED (N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin)	Sigma, Deisenhofen
Tris (Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan)	Sigma, Deisenhofen
Triton-X-100	BioRad, München
Tryptone	Difco, Detroit, USA
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
YNB (Yeast Nitrogen Base)	Difco, Detroit, USA

## 2.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (1 U/ $\mu$ l)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Klenow-Fragment der <i>E. coli</i> DNA-Polymerase I (2 U/ $\mu$ l)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
Restriktionsendonukleasen (2-50 U/ $\mu$ l)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim Promega, Heidelberg
SUPER SCRIPT <sup>TM</sup> II RNaseH <sup>-</sup> Reverse Transkriptase (200 U/ $\mu$ l)	Life Technologies, Eggenstein
T4-DNA-Ligase (1 U/ $\mu$ l)	Life Technologies, Eggenstein
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	Sigma, Deisenhofen
Trypsin (Rinderpankreas, 110 U/mg)	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim

## 2.3 Plasmide

pcDNA3.1-myc/his	Eukaryontischer Expressionsvektor, der die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einem C-terminalen myc- und his-Epitop exprimiert, Invitrogen, Niederlande
pCMV-5-FLAG	Eukaryontischer Expressionsvektor, der die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einem C-terminalen FLAG-Epitop exprimiert, Sigma, Deisenhofen
pCR3.1	Eukaryontischer Expressionsvektor, Invitrogen, Niederlande
G5-E1BTATA-CAT	enthält fünf Gal4-Bindestellen sowie die Ad2 E1B-TATA-Box vor dem CAT-Reportergen, zur Verfügung gestellt von R. Bernards, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande
phc-jun(-1600/+749)-CAT	enthält den humanen c-jun-Promotor von nt -1600 bis +740, zur Verfügung gestellt von A. J. van der Eb, Laboratory for Molecular Carcinogenesis, Sylvius, Laboratories, University of Leiden, Niederlande

pRc/RSV	Eukaryontischer Expressionsvektor, Invitrogen, Niederlande
pGEX-2T	Bakterieller Expressionsvektor, der die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einer N-terminalen GST-Proteindomäne exprimiert, Pharmacia Biotech, Freiburg
pYES2-MYR	Hefe-Expressionvektor (Uracil [Ura]- Selektion), der die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einer N-terminalen <i>v-src</i> Myristilisierungssequenz exprimiert (Aaronheim et al., 1997), zur Verfügung gestellt von H. Hennemann, Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums, Universität Essen
pADNS-SOS	Hefe-Expressionvektor (Leucin [Leu]- Selektion), der die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einem C-terminalen SOS- Anteil exprimiert (Aaronheim et al., 1997), zur Verfügung gestellt von H. Hennemann, Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums, Universität Essen

## 2.4 Nukleinsäuren

Heringssperma-DNA	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim
-------------------	----------------------------------------

## 2.5 Oligonukleotide

Die hier aufgelisteten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech GmbH (Ebersberg) oder Metabion (Martinsried) synthetisiert, entsalzt und lyophilisiert. Die Oligonukleotide wurden in H<sub>2</sub>O aufgenommen (Endkonzentration der Stammlösung je 100 pmol/μl). Zusätzlich synthetisierte Nukleotide (z.B. Restriktionsschnittstellen) in den aufgeführten Oligonukleotiden sind in Klammern gesetzt.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
5'-9.1 ATG	(ATATGGATCC)ATGCACGAGCGGCGGAGC
5'-pcDNA r-SREC	(ATATAAGCTT)ATGGCGCCCTCGGGCCCCGGT
3'-pcDNA r-SREC	(GCGCAAGCTT)AGTCTCATTTTCCATGGTTAA
5'-Hind TT ATG r-SREC	(ATATAAGCTTTT)ATGGCGCCCTCGGGCCC
5'-r-SREC ATG <i>Bam</i> HI	(ATATGGATCC)ATGGCGCCCTCGGGCCCCGGT
3'-r-SREC STOP <i>Bam</i> HI	(GCGCGGATCC)TTAAGTCTCGTTCTCCATAGT
3'-r-SREC <i>Hind</i> III	(GCGCAAGCTT)TCTCGTTCTCCATAGTTAA
3'-r-SREC STOP <i>Hind</i> III	(GCGCAAGCTT)TTAAGTCTCGTTCCCCATAG
5'-9.1 ATG <i>Hind</i> III	(ATATAAGCTT)ATGCACGAGCGGCGGAGCA
5'-CR2-S-CR3	(TCCCCCGGG)ATGGATTTATTGTGCTACGAG
3'-CR2-S-CR3	(TCCCCCGGG)ATCGGAAACAGGACTGTAAAT
5'-pYes 9.1	TGCTCTACTGGATCCCTGTGGTGTTCAT

## 2.6 Antikörper

Anti-Ad12 E1A-Antiserum  
polyklonales Schaf-Antiserum

Zur Verfügung gestellt von Phil Gallimore,  
University of Birmingham, England

Anti-Ad2 E1A AK (M73)  
polyklonaler Maus IgG AK

Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA

Anti-Actin AK  
polyklonaler Ziege IgG AK

Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA

Anti-FLAG-AK  
monoklonaler Maus IgG AK

Sigma, Deisenhofen

Anti-Kaninchen IgG-AK  
Peroxidase-konjugiert

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Anti-Maus IgG-AK Peroxidase-konjugiert	Calbiochem, Heidelberg
Anti-Maus IgG-AK Cy3 konjugiert	Dianova, Hamburg
Anti-myc-Epitop (9E10)-AK (monoklonaler Maus IgG-AK)	Invitrogen, Niederlande
Anti-Kaninchen IgG-AK Alexa Fluor 488 konjugiert	Molecular Probes, Göttingen
Anti-Schaf IgG-AK Peroxidase-konjugiert	Pierce, Rockford, USA; über Perbio, Helsingborg, Schweden
Anti-Ziege IgG-AK Alexa Fluor 488 konjugiert	Molecular Probes, Göttingen
Normales Kaninchen IgG-Antiserum	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA

## 2.7 Medien, Reagenzien und Materialien für die Zellkultur

100 x nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies, Eggenstein
6-Loch-Zellkulturschalen mit 3,5 cm Ø Vertiefungen, Zellkulturplatten, -flaschen, - schalen	Becton Dickinson, New York, USA, über Oehmen, Essen
DMEM	Life Technologies, Eggenstein
Fötale Kälberserum (FKS)	PAA, Marburg Life Technologies, Eggenstein
Geneticinsulfat (G 418)	PAA, Marburg
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
Penicillin G (1000 U/ml)	Hoechst, Frankfurt
Streptomycinsulfat	Sigma, Deisenhofen

## 2.8 Radiochemikalien

[ <sup>35</sup> S]-Methionin >37 TBq/mmol	ICN Biomedicals, Eschwege
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dCTP >111 TBq/mmol (spez. Aktivität: >3000 Ci/mmol)	ICN Biomedicals, Eschwege
D-Threo-[dichloracetyl-1- <sup>14</sup> C]-Chloramphenicol ~3,7 GBq/mmol	ICN Biomedicals, Eschwege

## 2.9 Molekulargewichtstandards

$\lambda$ -DNA-Größenstandard	Life Technologies, Eggenstein
100-bp DNA-Leiter	Life Technologies, Eggenstein
[ <sup>14</sup> C]-markierter SDS-PAGE Standard	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
SDS-PAGE Standards (gefärbt)	BioRad, München Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

## 2.10 Kits und spezielle Reagenzien

Auto Read <sup>TM</sup> Sequencing Kit	Pharmacia Biotech, Freiburg
BioRad Bradford-Reagenz	BioRad, München
Eukaryotic TA Expression Kit	Invitrogen, Niederlande
GeneRacer Kit	Invitrogen, Niederlande
Human Multiple Tissue Northern (MTN) <sup>TM</sup> Blot	Clontech, Heidelberg
Metafectene	Biontex, Martinsried
Mowiol	Calbiochem, Heidelberg
Plasmid-DNA-Maxipräparations-Kit Nucleobond AX 500	Macherey & Nagel, Düren
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Spin PCR Purification and Gelextraction Kit	Qiagen, Hilden

QIAshredder	Qiagen, Hilden
Rat Multiple Tissue Northern (MTN)™ Blot	Clontech, Heidelberg
Ready To Go DNA Labelling Beads	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
RNaseOUT (40 U/μl)	Life Technologies, Eggenstein
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Super-Signal-Ultra-Chemilumineszenz-Detektionssysteme (für Western-Blot)	Pierce, Rockford, USA; über Perbio, Helsingborg, Schweden
TNT Kit, Quick Coupled Transcription/Translation Systems	Promega, Heidelberg
TRIZOL-Reagenz	Life Technologies, Eggenstein

## 2.11 Filme, Filter, Membranen und besondere Verbrauchsmaterialien

Acid-washed-glass-Beads	Sigma, Deisenhofen
Dünnschichtchromatographie-Platten, Kieselgel, 0,2 mm Schichtdicke	Riedel-de Haen, Seelze
Elektroporationsküvetten, 0,4 mm	BioRad, München
Gluthation-Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hybond-C-plus Nitrocellulose-Membran	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein-G Sepharose	Pharmacia Biotech, Freiburg
Replikplatten ACCUTRAN	Schleicher & Schuell, Dassel
Röntgenfilme X-Omat AR	Kodak, Rochester, USA
Rotiszint eco plus Szintillationsflüssigkeit	Roth GmbH, Karlsruhe
Sephadex G-50-Säulen	Pharmacia Biotech, Freiburg
Sterivex-GS 0,22 μm Filter Unit	Millipore, Bedford, Massachusetts, USA
Whatman Filterpapier	Whatman, Maidstone, England



## 2.12 Spezielle Laborgeräte

Automatic Laser Fluorescence DNA Sequencer	Pharmacia Biotech, Freiburg
Automatic TLC-Linear Analyzer	Berthold, Overath
DNA Trio Thermoblock (PCR)	Biometra, München
Gene Pulser Elektroporator	BioRad, München
Mini-Protean-II-Cell	BioRad, München
Szintillationsmessgerät Delta 300, Searle Analytic Incorporation	über Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	BioRad, München
Ultraschalldesintegrator	Branson, USA
Zeiss Laser Scan Mikroskop (LSM) 510	Zeiss, Obercochem

## 2.13 Puffer und Lösungen

Hier nicht aufgeführte Zusammensetzungen von Puffern und Lösungen wurden den Laborhandbüchern „Molecular Cloning: a laboratory manual, second edition“ (Sambrook *et al.*, 1989) oder „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1997) entnommen.

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	29,2 g Acrylamid 0,8 g N,N'-Methylen-Bisacrylamid mit H <sub>2</sub> O ad 100 ml
Ampicillinlösung	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O
APS-Lösung	10% (w/v) APS in H <sub>2</sub> O
DNA-Probenpuffer (6 x)	150 mM EDTA 0,25% (w/v) Bromphenolblau 0,25% (w/v) Xylenxanol FF 30% (v/v) Glycerin
dNTP-Mix (für PCR)	je 1,25 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in A. bidest

Gelfärbelösung (SDS-PAGE)	450 ml H <sub>2</sub> O 450 ml Methanol 100 ml Eisessig 2,5 g Coomassie Brilliant Blue
Gelfixierlösung (SDS-PAGE)	50% (v/v) 2-Propanol 7% (v/v) Essigsäure
GST PD+150	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 0,1% (v/v) Triton-X-100 5 mM EDTA 20 mM NaF 1 mM DTT 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 0,5 mM Pefabloc 2 µg/µl BSA
Hefe-Aufbruchpuffer	2% (v/v) Triton-X-100 1% (w/v) SDS 100 mM NaCl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 1 mM EDTA
IPTG-Lösung	1 M in H <sub>2</sub> O (bei -20°C gelagert)
LiPEG	100 mM Lithiumacetat 40% (w/v) PEG3350 in TE-Puffer, pH 7,5
LiSORB	100 mM Lithiumacetat 1 M Sorbitol in TE-Puffer, pH 7,5
NB-Puffer	150 mM NaCl 10 mM Bicine, pH 8,35
NETN-Puffer	20 mM Tris/HCl, pH 8 100 mM KCL 1 mM EDTA 0,5% NP-40
Paraformaldehydlösung	70% (v/v) PBS 4% (w/v) Paraformaldehyd 30 mM Galaktose pH 7,4 mit HCl einstellen

PBS	4 mM MgSO <sub>4</sub> 7 mM CaCl <sub>2</sub> 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PBS <sup>=</sup>	wie PBS, ohne MgSO <sub>4</sub> und CaCl <sub>2</sub>
PC+150-Puffer	20 mM HEPES/KOH pH 7,9 150 mM KCl 12,5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,2 mM EDTA 0,05% (v/v) NP-40 0,05 % (v/v) Tween 20 0,5 mM Pefabloc 2 µg/µl BSA
PEG1000, 40%	40% PEG1000 200 mM Bicine, pH 8,35 bei -20°C gelagert
Permeabilisierungslösung	PBS 0,3% (v/v) Triton-100X 0,1% (w/v) Natriumcitrat
Propidiumjodidlösung	5% Propidiumjodid (w/v) in H <sub>2</sub> O
PS-Lösung	1,5 g Penicillin 2,5 g Streptomycinsulfat 2 g NaCl 0,1 g KCl 0,25 g Glucose 0,1 g NaHCO <sub>3</sub> mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt
RT-Erststrangsynthese-Puffer	250 mM Tris/HCl, pH 8,3 375 mM KCl 15 mM MgCl <sub>2</sub>
SBEG-Puffer	1 M Sorbitol 10 mM Bicine, pH 8,35 3% (v/v) Ethylenglycol

SDS-PAGE-Laufpuffer (1 x)	250 mM Tris/HCl, pH 8,3 2,550 mM Glycin 0,1% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4% (w/v) SDS
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4% (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (6 x)	0,3 M Tris/HCl pH 6,8 0,6 M DTT 12% (w/v) SDS 60% (v/v) Glycerin 0,6% (w/v) Bromphenolblau
SSC (20 x)	3,0 M NaCl 0,3 M Na <sub>3</sub> -Citrat
TBS	10 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBS-T	TBS mit 0,1% (v/v) Tween 20
Transferpuffer (für Western- Blotting)	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,037% (w/v) SDS für Proteine < 180kDa oder 0,8% (w/v) SDS für Proteine > 180kDa 20% (v/v) Methanol
VT-Lösung	0,5 M EDTA 2,5 g/l Trypsin in PBS <sup>=</sup>
YNB-(+)-Galactose	0,85 g YNB (ohne AS, ohne (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) 2,5 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 15 g Galactose 10 g D-(+)-Raffinose 10 g Glycerin 0,34 g Aminosäuremix ad 500 ml mit A. bidest.
YNB-(-)-Galactose	YNB-(+)-Galactose ohne Galactose

YNB-Glucose	0,85 g YNB (ohne AS, ohne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) 2,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g D-(+)-Glucose 10 g Glycerin 0,34 g Aminosäuremix ad 500 ml mit A. bidest.
YPD	10 g Bacto-yeast extract 20 g Bacto-Peptone 20 g Glucose ad 1000 ml mit A. bidest
2 x YT-Medium	16 g Tryptone 10 g Bacto-yeast extract 5 g NaCl ad 1000 ml mit A. bidest

## 2.14 Bakterienstämme

*E. coli* K12 DH5 $\alpha$  [*supE44*,  $\Delta$ *lacU169* ( $\phi$ 80*lacZ* M15) *hsdR* 17 *recA1* *endA1* *gyrA96*, *thi1* *relA1*] ist ein rekombinationsdefekter Bakterienstamm zur Vermehrung von Derivaten der pBR322-Plasmide (Life Technologies, Eggenstein).

*E. coli* K12 DH10B [ $\text{F}^-$  *mcrA*,  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*),  $\phi$ 80*dlac* Z $\Delta$ M15,  $\Delta$ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*,  $\Delta$ (*ara*, *leu*)7697, *galU*, *galK*,  $\alpha^-$ , *rpsL*, *nupG*] ist ein elektrokompeter Bakterienstamm (Gibco BRL, Eggenstein).

*E. coli* K12 BL21 [ $\text{F}^-$ , *ompT*, *hsdS* ( $\text{r}_\text{B}^-$ ,  $\text{m}_\text{B}^-$ ), *gal*] ist ein Protease-defizienter Bakterienstamm zur Expression von Fusionsproteinen (Pharmacia Biotech, Freiburg).

## 2.15 Hefestamm

*Cdc25-2* ist ein temperatursensitiver *S. cerevisiae*-Stamm. Dieser Hefestamm enthält eine Mutation im *cdc25-2*-Gen, das den G-Protein-Austauschfaktor SOS exprimiert (Aaronheim *et al.*, 1997)

## 2.16 Zelllinien

COS7-Zellen	etablierte SV40-transformierte Nierenzelllinie der Grünen Meerkatze, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA (Gluzman, 1981)
HEK-12-Zellen	Humane embryonale Nierenzelllinie, transformiert durch Transfektion des <i>EcoR</i> IC-Fragments von Ad12 (Whittaker et al., 1984); zur Verfügung gestellt von P. Gallimore, University of Birmingham, UK
HeLa-tk <sup>-</sup> -Zellen	Humane epitheloide Cervix-Karzinomzelllinie; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Gey <i>et al.</i> , 1952)
KB-Zellen	Humane epidermale Rachen-Karzinomzelllinie; American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, USA (Gey <i>et al.</i> , 1952)

### 3. Methoden

#### 3.1 Allgemeine Methoden

Hier nicht gesondert aufgeführte grundlegende molekularbiologische Standardmethoden wurden den Laborhandbüchern „Molecular cloning: A laboratory manual, second edition“, (Sambrook *et al.*, 1989) und „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1997) entnommen.

Alle Arbeiten mit Hefe- und Säugerzellen bzw. mit Bakterien (*E. coli*-Stämme) wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Lösungen und Materialien wurden bei 121°C und 1 bar autoklaviert, Lösungen mit hitzeempfindlichen Komponenten wurden sterilfiltriert. Die Arbeiten mit Bakterien, Nukleinsäuren und Proteinen wurden, soweit nicht anders aufgeführt, unter Eiskühlung der Proben durchgeführt.

#### 3.2 Isolierung und Charakterisierung von Nukleinsäuren

Die Aufreinigung PCR-amplifizierter DNA sowie die Isolierung von DNA aus Agarose erfolgte unter Verwendung des „QIAquick Spin PCR Purification and Gelextraction“-Kits der Firma Qiagen. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im quantitativen Maßstab erfolgte unter Verwendung des „Plasmid-DNA-Maxipräparations-Kits Nucleobond AX 500“ gemäß den Angaben des Herstellers (Macherey & Nagel). Die Plasmid-DNA-Maxipräparation beruht hierbei auf einer optimierten Form der alkalischen Lyse-Methode nach Birnboim und Doly (1979).

DNA-Sequenzierungen wurden mit dem „AutoRead-Sequencing“-Kit auf einem ALF (Automated Laser Fluorescent)-DNA Sequenzierer nach Angaben des Herstellers Pharmacia Biotech oder von den Sequenzierfirmen Seqlab GmbH (Göttingen) bzw. GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt.

##### 3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, Mullis *et al.*, 1986)

Die PCR ist eine *in vitro* Methode zur sequenzspezifischen Amplifikation distinkter DNA-Sequenzen unter Verwendung synthetisch hergestellter Oligonukleotide (Primer). Diese Methode wurde zum Nachweis der Integration von DNA-Sequenzen in das Genom von

Säugerzellen, zur Identifizierung Insert-positiver Bakterienklone, zum Nachweis durch RT-PCR generierter cDNAs und zur Klonierung von DNA-Sequenzen angewendet.

### **3.2.2 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)**

Der Nachweis spezifischer mRNAs in Gesamt-RNA aus Säugerzellen erfolgte mittels RT-PCR. Die Erststrangsynthese erfolgte unter Verwendung des RT-PCR-Kits der Firma Invitrogen. Der Ansatz, bestehend aus 1-5 µg Gesamt-RNA und 2 pmol eines spezifischen 3'-Primers, wurde mit DEPC-behandeltem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt, 10 min bei 70°C inkubiert und anschließend 2 min auf Eis schockgeköhlt. Nach Zugabe von 4 µl RT-Erststrangpuffer, 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM) und 2 µl 0,1 M DTT wurde der Ansatz 2 min bei 42°C inkubiert. Die Synthese des cDNA-Stranges erfolgte nach Zugabe von 1 µl (200 U) Reverse-Transkriptase mit nachfolgender Inkubation für 50 min bei 42°C. Die Reverse-Transkriptase wurde durch 15-minütige Inkubation bei 70°C inaktiviert.

Die Analyse der generierten cDNA erfolgte durch PCR-Amplifikation mit spezifischen Primern und anschließender Agarose-Gelelektrophorese.

### **3.2.3 Isolierung der Gesamt-RNA aus Rattengewebe**

Das Rattengewebe (Herz) wurde nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert. Zur Aufarbeitung wurde das Gewebe in einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser zu einem homogenen Pulver verarbeitet. Die anschließende Isolierung der Gesamt-RNA aus dem Gewebe erfolgte mittels des TRIZOL-Reagenzes nach Angaben des Herstellers (Life Technologies). Zur Aufreinigung wurden 100 mg Herzgewebe eingesetzt.

## **3.3 Protein-Protein-Interaktionsstudien mit Hilfe des Hefe „SOS-Two-Hybrid“-Systems**

Das Hefe „SOS-Two-Hybrid“-System (Aronheim *et al.*, 1997) ermöglicht die Analyse von spezifischen Protein-Protein-Interaktionen unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen in Hefezellen. Dieses Hefesystem erlaubt es, im Gegensatz zu dem klassischen Hefe



„Gal4-Two-Hybrid“-System (Chevray und Nathans, 1992), Interaktionsanalysen unter Verwendung transaktivierender Proteindomänen als Köder durchzuführen. Der Selektionsmechanismus des „SOS-Two-Hybrid“-Systems beruht auf der Interaktion zwischen einem SOS-Fusionsprotein und einem Fusionsprotein, das durch ein Myristilisierungssignal (MYR) an der Zellmembran verankert ist (siehe **Kap. 4.1**). Die interaktionsabhängige Translokation des SOS-Fusionsproteins durch Interaktion mit dem MYR-Fusionsprotein stellt den Ras-abhängigen Signaltransduktionsweg des SOS-defizienten *S. cerevisiae* Stammes *cdc25-2* wieder her und ermöglicht ein Wachstum der Hefen bei selektiver Temperatur von 36°C.

### 3.3.1 Amplifikation der Rattenhypophysen-cDNA-Expressionsbank

Die Rattenhypophysen-cDNA-Expressionsbank (Aronheim *et al.*, 1997) mit  $2 \times 10^6$  unabhängigen Klonen (zur Verfügung gestellt von H. Hennemann, Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums, Universität Essen), die im Hefe „SOS-Two-Hybrid“-System eingesetzt werden sollte, wurde mittels Elektroporation amplifiziert. Hierfür wurden 20 µl des elektrokompenten Bakterienstammes *E. coli/DH10B* und 20 ng Bibliotheks-cDNA eingesetzt (im Hefe-Expressionsvektor pYes2-MYR) und die Elektroporation bei 1800 V und 100 Ohm durchgeführt. Nach Zugabe von 1,2 ml SOC-Medium und einstündiger Inkubation (220 rpm, 37°C) wurde die Bakteriensuspension mit 30,5 ml SOC-Medium verdünnt und jeweils 860 µl dieser Suspension auf einer 507 cm<sup>2</sup> LB-Agarplatte (100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Bakterienklone mit 40 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) pro Platte von der Oberfläche gelöst. Die Bakteriensuspension wurde eine Stunde bei 37°C und 220 rpm inkubiert und anschließend eine DNA-Präparation durchgeführt. Die isolierte Plasmid-cDNA wurde durch *EcoRI/XhoI*-Restriktionsendonukleaseverdau charakterisiert.

### 3.3.2 Herstellung und Transformation kompetenter Hefezellen

Die Herstellung kompetenter Hefezellen des Stammes *S. cerevisiae cdc25-2* sowie deren Transformation mit Plasmid-DNA der cDNA-Expressionsbank erfolgte nach der Vorschrift von Schiestl und Gietz (1989). Die Hefezellen wurden mit den Hefe-Expressionsvektoren pADNS-SOS-CR2-S-CR3 (exprimiert das SOS-CR2-S-CR3-Fusionsprotein; Leucinmangel-

Selektionsgen) und pYes2-mGAP (exprimiert mGAP; Tryptophanmangel-Selektionsgen) stabil kotransformiert (siehe **Kap. 4.1.2**). Zur Transformation mit der cDNA-Expressionsbank wurden pro Ansatz 3 µg Rattenhypophysen-cDNA (pYes2-MYR-cDNA; Uracilmangel-Selektionsgen) und 50 µg fragmentierte Carrier-DNA (Heringssperma-DNA), zur Erhöhung der Transformationseffizienz, eingesetzt. Anschließend wurden die Hefen zur Vorselektion der transformierten Zellen auf YNB-Glucose<sup>-Leu,-Trp,-Ura</sup>-Platten ausplattiert und für 3-4 Tage bei 25°C inkubiert.

### 3.3.3 Selektive Wachstumsbedingungen zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen im Hefe „SOS-Two-Hybrid“-System

Zur Selektion Interaktions-positiver Klone im Hefe „SOS-Two-Hybrid“-System wurden Replika-Plattierungen angefertigt. Der Hefe-Expressionsvektor pYes2-MYR exprimiert einen Galactose-Promotor (Gal1-Promotor, cDNA-Bank wird nur in Anwesenheit von Galactose exprimiert), womit die Selektion auf YNB-(+)-Galactose<sup>-Leu,-Trp,-Ura</sup> bzw. YNB-(-)-Galactose<sup>-Leu,-Trp,-Ura</sup>-Platten bei nicht-permissiver Temperatur von 36°C erfolgen kann. Die Hefeklone wurden von YNB-Glucose<sup>-Leu,-Trp,-Ura</sup>-Platten auf Selektionsplatten übergestempelt und bei 36 °C inkubiert. Nach 3-4 Tagen wurden Hefe-Klone, die auf YNB-(+)-Galactose-Platten wuchsen und somit eine Galactose-Abhängigkeit zeigten, selektiert und erneut auf YNB-Glucose<sup>-Leu,-Trp,-Ura</sup>-Platten bei 25°C inkubiert. Falsch-positive Klone, die sowohl auf YNB-(+)- als auch auf YNB-(-)-Galactose-Platten wuchsen, wurden verworfen. Klone, die nach dreimaliger Selektion Galactose- und Temperatur-Abhängigkeit zeigten, wurden als potentiell Interaktions-positiv eingestuft und ihre Plasmid-DNA wurde präpariert (siehe **Kap. 3.3.4**).

Nach Isolierung und Identifikation der pYes2-MYR-cDNA Plasmide durch Restriktionsendonukleaseverdau wurden diese mit der Köder-DNA (pADNS-SOS-CR2-S-CR3) in kompetente Hefezellen des *S. cerevisiae* Stammes *cdc25-2* (siehe **Kap. 3.3.5**) kotransformiert, wofür 1-2 µg der jeweiligen Plasmid-DNA eingesetzt wurden. Als Kontrollen dienten (1) das jeweilige pYes2-MYR-cDNA-Bank Plasmid mit dem pADNS-SOS-Leervektor (exprimiert nur die SOS-Domäne) und (2) das pADNS-SOS-CR2-S-CR3-Plasmid mit dem pYes2-MYR-Leervektor (exprimiert nur das Myristilisierungssignal). Die Transformationsansätze wurden auf selektiven Agarplatten (YNB-Glucose<sup>-Leu,-Ura</sup>) ausplattiert und bei 25°C im Brutschrank 3-4 Tage inkubiert. Anschließend wurden von jedem Ansatz vier Klone selektiert und wie zuvor inkubiert. Die Hefeklone wurden auf Replika-Platten (YNB-(+)-Galactose<sup>-Leu,-Ura</sup> und YNB-(-)-Galactose<sup>-Leu,-Ura</sup>) übergestempelt und bei 36°C

inkubiert. Die Hefe-Klone, die unter Selektionsdruck in Abhängigkeit von Galactose und Köderplasmid bei 36°C ein Wachstum zeigten, wurden als Interaktions-positive Klone eingestuft.

### 3.3.4 Präparation der Plasmid-DNA aus Hefezellen

Zur Präparation der Plasmid-DNA aus Hefezellen wurden 10 ml YNB-Glucose<sup>-Leu,-Trp,-Ura</sup> mit einem potentiell Interaktions-positiven Klon angeimpft und 2-3 Tage bei 25°C und 220 rpm bis zum Erreichen der stationären Phase inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde nach Vorschrift isoliert und aufgereinigt (Aronheim *et al.*, 1997). Anschließend wurden elektrokompetente Bakterien des Stammes *E. coli XL2-blue*, die zuvor nach Vorschrift des Herstellers des Elektroporators (BioRad) präpariert wurden, mit der Plasmid-DNA transformiert, wodurch eine Vereinzelung der drei in den Hefezellen enthaltenen Plasmide (pADNS-SOS-CR2-S-CR3; pYes2-MYR-cDNA; pADNS-mGAP) möglich war. Nach DNA-Minipräparationen von jeweils zehn Klonen wurde zur Differenzierung zwischen den Plasmiden und zur Identifizierung der cDNA-Bank-Plasmide ein *EcoRI/XhoI*-Restriktionsendonukleaseverdau durchgeführt.

### 3.3.5 Herstellung kompetenter Hefezellen (Klebe *et al.*, 1983)

Die Herstellung kompetenter Hefezellen des temperatursensitiven *S. cerevisiae*-Stammes *cdc25-2* erfolgte nach der Vorschrift von Klebe *et al.* (1983). Hierzu wurden 100 µl einer *cdc52-2*-Hefesuspension in 10 ml YPD-Medium angeimpft und bei 25°C für 18 h im Schüttler (220 rpm) inkubiert. Die Kultur wurde im Verhältnis 1:25 mit YPD-Medium verdünnt und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert (6-8 h, 25°C, 220 rpm). Die Hefezellen wurden abzentrifugiert (425 x g, 3 min) und in 125 ml SBEG-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde bei RT zentrifugiert (425 x g, 3 min) und die Hefezellen in 5 ml SBEG-Puffer resuspendiert. Die kompetenten *cdc25-2*-Hefen wurden bis zur Transformation in 100 µl Aliquots bei -80 °C gelagert.

### 3.4 Zellkultur

Die Kultivierung der adhärenenten Zelllinien HeLa-tk<sup>-</sup>, KB, HEK12, COS7 und 293 erfolgte in beschichteten Zellkulturgefäßen bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Als Nährmedium diente DMEM, dem 10% fötales Kälberserum (FKS), 1,5% 100 x nicht essentielle Aminosäuren, 1,5% einer 2 mM L-Glutaminlösung und jeweils 100 µg/ml der Antibiotika Penicillin und Streptomycin zugesetzt wurde (im Folgenden als DMEM-Vollmedium bezeichnet). Für alle routinemäßigen Zellkulturarbeiten wurden die verwendeten Lösungen auf 37°C vorgewärmt.

Konfluent gewachsene Zellen wurden nach einmaligen Waschen mit PBS<sup>-</sup> durch Trypsinbehandlung von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes abgelöst. Die Zellen wurden in DMEM-Vollmedium resuspendiert und im Verhältnis von 1:5 bis 1:10 in neue Zellkulturgefäße überführt.

Zur längerfristigen Lagerung der Zellen wurden diese wie beschrieben abgelöst und nach Zentrifugation (1 min, 600 x g, RT) in Einfriermedium (DMEM-Vollmedium mit 20% FKS und 10% DMSO) resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden zunächst in Kryoröhrchen schonend bei -80°C eingefroren, welche dann nach 24 h zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

#### 3.4.1 Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektion eukaryontischer Zellen erfolgte mittels des liposomalen Transfektionsreagenzes Metafectene gemäß den Angaben des Herstellers (Biontex).

Für die Transfektion wurden 2 bis  $2,5 \times 10^5$  Zellen in 6-Loch-Zellkulturplatten (Wachstumsfläche 9 cm<sup>2</sup>) bzw. 2,5 bis  $3,0 \times 10^6$  Zellen in 100 mm Durchmesser Zellkulturschalen (Wachstumsfläche 60 cm<sup>2</sup>) in DMEM-Vollmedium ohne Antibiotika ausgesät. Die Zellen wurden 18 bis 24 h bei 37°C inkubiert, so dass die Zellen zu Transfektionsbeginn 50-80% konfluent waren. Anschließend wurden die Zellen mit dem Transfektionsansatz, bestehend aus DMEM-Vollmedium ohne Antibiotika und dem DNA-Lipidkomplex, inkubiert. Nach 5-6 stündiger Inkubation wurde der Transfektionsansatz durch DMEM-Vollmedium ersetzt und die Zellen wie in **Kap. 3.4** beschrieben kultiviert. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 24-48 h.

### 3.4.2 Infektion von Säugerzellen mit Adenovirus (Ad12)

Zur Infektion humaner Zellen mit Adenovirus wurden hochkonzentrierte Virus-Stocklösungen (Ad12, Stamm Hui) hergestellt.

Hierfür wurden 70-90% konfluent gewachsene KB-Zellen in 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen mit dem kleinstmöglichen Volumen an virushaltigem Medium (DMEM-Vollmedium ohne Antibiotika und FKS) inkubiert. Dieser Infektionsansatz wurde alle 30 min leicht geschwenkt. Nach 2 h wurde der infektiöse Überstand abgenommen und durch DMEM-Vollmedium ersetzt. 72 h nach Infektion wurden die Zellen geerntet und abzentrifugiert (5 min, 1500 x g, 4°C). Die Zellen wurden in dem 5-fachen Volumen DMEM-Vollmedium (ohne Antibiotika und FKS) resuspendiert und durch mehrmaliges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei 37°C lysiert. Nach Zentrifugation der Zelltrümmer (4000 x g, 4°C) wurde der infektiöse Überstand in DMEM-Vollmedium (ohne Antibiotika und FKS) verdünnt und ein Virustiter, der für die Infektion von 70-80% der Zellen notwendig war, eingestellt. Der Überstand wurde anschließend zur Infektion humaner Zellen wie zuvor beschrieben verwendet.

### 3.4.3 Etablierung stabiler Zelllinien

Zur Etablierung von Zelllinien, die ein Transgen stabil exprimieren, wurden KB-Zellen mit dem entsprechenden Vektorkonstrukt transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion passagiert, unterschiedliche Verdünnungen der Zellsuspension wurden auf Zellkulturschalen überführt und unter Selektionsdruck (G418 in DMEM-Vollmedium) über einen Zeitraum von zwei Wochen kultiviert. Zellfoci mit einem Durchmesser von 2-3 mm wurden mit Hilfe von Klonierungsrings isoliert, von der Oberfläche der Zellkulturplatte durch Trypsinbehandlung abgelöst wie in **Kap. 3.4** beschrieben in 24-Loch-Zellkulturgefäßen kultiviert.

Anschließend wurden die Zelllinien durch Westen-Blotting auf Expression des Transgens hin untersucht.

## 3.5 Bestimmung der CAT-Aktivität in Zellextrakten

Die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) ist ein bakterielles Enzym, welches das Antibiotikum Chloramphenicol zu seinen mono- und diacetylierten Derivaten umsetzt, wodurch die antibiotische Wirkung beseitigt wird. Da das Enzym nicht in eukaryotischen Zellen vorkommt, dort aber leicht zu exprimieren und nachzuweisen ist wird das CAT-Gen

als Reportergen zur Quantifizierung eukaryontischer Promotor-Funktionen verwendet. Eukaryontische Zellen werden hierfür mit dem bakteriellen CAT-Reportergen, dem die eukaryontische Promotor-Region vorgeschaltet wurde, transient transfiziert. Anschließend werden die Zellextrakte mit [ $^{14}\text{C}$ ]-Chloramphenicol und Acetyl-Coenzym A (als Donor für Acetyl-Gruppen) inkubiert. Die Reaktionsprodukte der CAT-Reaktion werden durch Dünnschicht-Chromatographie analysiert. Der Grad der [ $^{14}\text{C}$ ]-Chloramphenicol-Umsetzung entspricht der Expression des CAT-Gens, was wiederum ein Maß für die Aktivität des zu untersuchenden Promotors ist.

Die Bestimmung der CAT-Aktivität transient transfizierter eukaryontischer Zellen erfolgte nach Brockmann und Mitarbeitern (1996). 10-20  $\mu\text{g}$  Gesamtzellextrakt wurden mit 2  $\mu\text{l}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Chloramphenicol und 25  $\mu\text{l}$  einer 4 mM Acetyl-CoA-Lösung (in 0,25 M Tris/HCl, pH 7,5) gemischt. Das Probevolumen wurde auf 150  $\mu\text{l}$  (0,25 M Tris/HCl, pH 7,5) eingestellt und die Ansätze 1-2 h bei 37°C inkubiert. Die anschließende Dünnschicht-Chromatographie zur Auftrennung unverändertem Chloramphenicols sowie mono- und diacetylierter Formen erfolgte für 45 min in einer dampfdruckgesättigten DC-Kammer. Als Laufmittel diente ein Gemisch aus Chloroform:Methanol (Verhältnis 19:1). Nach Trocknung der Dünnschicht-Chromatographie-Platten wurde die Quantifizierung des [ $^{14}\text{C}$ ]-markierten Chloramphenicols mit dem „Automatic TLC-Linear Analyzer“ der Firma Berthold durchgeführt.

### 3.6 Hybridisierung eines Northern-Blots

Ein „Rat (bzw. Human) Multiple Tissue Northern (MTN)<sup>TM</sup> Blot“ wurde nach einstündiger Vorhybridisierung mit der denaturierten, radioaktiv-markierten DNA-Sonde (siehe **Kap. 3.6.1**), mit einer spezifische Aktivität von  $\geq 10^8$  cpm/ml nach Angaben des Herstellers (Clontech) inkubiert. Das Waschen der Membran erfolgte ebenfalls nach Angaben des Herstellers. Die Membran wurde anschließend zur Autoradiographie gegen einen Röntgenfilm (Biomax, Kodak) über einen Zeitraum von 1 Stunde bis zu 3 Tagen exponiert.

Um die Northern Blots für weitere Analysen verwenden zu können, wurde die DNA-Sonde anschließend nach Vorschrift des Herstellers entfernt.

### **3.6.1 Herstellung [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP markierter DNA-Sonden**

Die radioaktive Markierung von DNA-Sonden erfolgte mit dem „Ready To Go Labelling Beads“ nach Angaben des Herstellers (Pharmacia, Freiburg) nach dem Prinzip des „Hexanucleotid Random Primings“ (Feinberg und Vogelstein, 1983). Für die Sonden wurden 50 ng DNA und 5  $\mu$ l (10 mCi/ml) [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP eingesetzt. Nicht eingebaute radioaktive Desoxycytosintriphosphate wurden nach der Markierung durch Chromatographie über Sephadex-G50-Säulen entfernt. Die Aktivität der Sonde wurde im Szintillationsmeßgerät gemessen und die spezifische Aktivität bestimmt.

## **3.7 Analyse von Proteinen**

### **3.7.1 Herstellung von Gesamzell-Proteinextrakten aus Säugerzellen**

Zur Herstellung von Gesamzell-Proteinextrakten aus Säugerzellen wurden die Zellen mit kaltem PBS<sup>-</sup> gewaschen, durch Abschaben geerntet und durch Zentrifugation pelletiert (4 °C, 1500 x g). Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden anschließend in NP-40-Puffer resuspendiert und durch mehrmaliges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen bei 37°C lysiert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (30 min, 52000 x g, 4 °C) und der klare Überstand abgenommen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm nach der Methode von Bradford (1976).

### **3.7.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem spezifischen Molekulargewicht erfolgte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen im diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli (1970). Die Herstellung der Trenngele (im Bereich von 8-18%, C-Wert: 2,7%) und der Sammelgele (5%, C-Wert: 2,7%) erfolgte nach der Methodensammlung von Sambrook *et al.* (1989). Die Proteine wurden mit SDS-Probenpuffer (Endkonzentration: 1 x SDS-Probenpuffer) gemischt und 5 min gekocht. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in einer „Mini-Protean-II-Dual SLAB“-Kammer (BioRad). Die Proteine wurden nach dem Gellauf durch Coomassie-Färbung oder nach Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran immunologisch nachgewiesen.

### 3.7.3 Western-Blotting

Zum immunologischen Nachweis von Proteinen in Gesamtzellextrakten wurden diese wie in **Kap. 3.7.2** gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Elektroblothing („Semi-Dry-Blot“-Apparatur; 60-90 min, 1,7 mA/cm<sup>2</sup>, RT) auf eine Nitrocellulosemembran (Hybond C-extra) transferiert. Die Membran wurde zuvor durch kurzes Waschen in H<sub>2</sub>O und einer nachfolgenden Äquilibration in Transferpuffer aktiviert. Der Transfer der Proteine erfolgte hierbei in Transferpuffer mit 0,037% SDS. Anschließend wurde die Membran 1 h in TBS-T/10% Milchpulver unter leichtem Schütteln bei RT blockiert und in derselben Lösung 1-16 h mit dem Primärantikörper (Verdünnung 1:250 bis 1:5000, je nach Antikörper) inkubiert. Die Membran wurde dreimal für je 10 min in TBS-T gewaschen und anschließend mit einem sekundären, Meerrettich-Peroxidase konjugierten Antikörper (1:2000 bis 1:150000, je nach Antikörper) für 1 h in TBS-T/1% Milchpulver bei RT inkubiert. Nach erneuten Waschschritten (3 x 10 min in TBS-T, 2 x 5 min in TBS) erfolgte der Nachweis der Antigen-Antikörperkomplexe mit dem „Super-Signal-Ultra-Chemilumineszenz“-Detektionssystem gemäß den Angaben des Herstellers (Pierce).

Um die Membran weiteren Antikörperreaktionen unterziehen zu können wurden die Antigen-Antikörperkomplexe durch Inkubation in TBS/0,2% Tween-20 für 45 min bei 70°C unter leichtem Schütteln dissoziiert. Anschließend konnte die Membran nach kurzem Waschen in TBS in einer erneuten Antikörperreaktion eingesetzt werden.

## 3.8 Protein-Protein-Interaktionsanalysen

### 3.8.1 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-gekoppelten Fusionsproteinen aus bakteriellen Extrakten erfolgte mittels Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose 4B. Hierfür wurden prokaryontische Expressionsvektoren des pGEX-Systems, die nach Induktion mit IPTG die entsprechenden DNA-Fragmente als Fusionsproteine mit N-terminaler GST-Domäne (26 kDa, aus *Schistosoma japonicum*, Smith und Johnson, 1988) exprimieren, in Bakterien des Stammes *E. coli/BL21* transformiert.



### **(1) Vorbereitung der Glutathion-Sepharose Matrix**

500 µl Glutathion-Sepharose 4B wurden zweimal mit 1000 µl NETN-Puffer gewaschen und anschließend mit 1000 µl NETN-Puffer und 1,8 mg/ml Elk-Milchpulver 15 min bei 4°C auf dem Schüttelrad inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen abzusättigen. Die Matrix wurde abzentrifugiert, in 500 µl NETN-Puffer aufgenommen und bis zur Zugabe des Bakterienextraktes auf Eis gelagert.

### **(2) Herstellung des Bakterienextraktes und Aufreinigung der Proteine**

Für die Herstellung des Bakterienextraktes wurde ein Einzelklon der transformierten Bakterien in 100 ml 2 x YT-Medium (100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Übernachtskultur wurde im Verhältnis 1:10 mit 2 x YT-Medium (100 µg/ml Ampicillin) verdünnt und bei 37°C und 200 rpm bis zum Erreichen der OD<sub>600</sub> 1,0 inkubiert. Anschließend wurde die Expression des GST-Fusionsproteins durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 100 mM) und Inkubation für zwei Stunden induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (10 min, 2000 x g), der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 10 ml NETN-Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung und unter Eiskühlung der Suspension. Nach anschließender Zentrifugation (4°C, 6200 x g, 20 min) wurde das Lysat mit 300 µl der vorbereiteten Glutathion-Sepharose-Matrix zur Immobilisierung der Fusionsproteine für eine Stunde auf dem Schüttelrad bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (78 x g, 1 min, 4°C) wurde das Lysat-Glutathion-Sepharose Gemisch dreimal in 5 ml NETN-Puffer gewaschen. Die an Glutathion-Sepharose immobilisierten Fusionsproteine wurden abschließend in 500 µl NETN-Puffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration der GST-Fusionsproteine wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt, die Fusionsproteine aliquotiert und bei -80°C gelagert. Zur qualitativen Überprüfung der Aufreinigung der GST-Fusionsproteine wurden (1.) die Bakteriensuspension vor IPTG-Induktion, (2.) die Bakteriensuspension nach IPTG-Induktion und (3.) 10 µg der aufgereinigten GST-Fusionsproteine einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe **Kap. 3.7.2**) unterzogen.

## **3.8.2 In vitro Transkriptions/Translations-System**

Die *in vitro* Expression von Proteinen erfolgte mit einem gekoppelten Transkriptions/Translations-System der Firma Promega (T3 „TNT Coupled Transcription/Translation System“) nach Angaben des Herstellers. Die Effizienz der *in vitro*

Transkription/Translation wurde anschließend mittels eines Inkorporationsversuches überprüft. Eine quantitative und qualitative Analyse der Translationsprodukte erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe **Kap. 3.7.2**) und anschließender Fluorographie zur Detektion der [<sup>35</sup>S]-Methionin markierten Proteine.

### 3.8.3 GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen

Mit Hilfe von GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen lassen sich *in vitro* Protein-Protein-Interaktionen nachweisen.

Nach Aufreinigung und Expression der GST-Fusionsproteine (siehe **Kap. 3.8.1**) und Immobilisierung an der Gluthation-Sepharose-Matrix erfolgte die Inkubation von jeweils 20 µg Fusionsprotein mit  $1 \times 10^5$  cpm des *in vitro* translatierten, [<sup>35</sup>S]-markierten Proteins. Die Bindungsreaktionen erfolgten in 500 µl PC+150-Puffer für 1 h bei RT. Hiernach wurden die über Glutathion-Sepharose immobilisierten Fusionsprotein-Protein-Komplexe abzentrifugiert (78 x g, 1 min, 4°C) und fünfmal mit PC+150-Puffer gewaschen. Zur Detektion der Protein-Protein-Interaktionen wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Fluorographie durchgeführt.

## 3.9 Immunpräzipitationen

Für Immunpräzipitationen wurden Säugerzellen wie in **Kap. 3.4.1** beschrieben transient transfiziert. 48 h nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen mit kaltem PBS<sup>-</sup> gewaschen, mittels eines Gummischabers von der Oberfläche der Zellkulturschale gelöst und abzentrifugiert (600 x g, 10 min, 4°C). Das Zellpellet wurde in NP-40-Puffer resuspendiert und zum Zellaufschluss für 30 min bei 4°C geschüttelt. Nach Zentrifugation (20 min, 51700 x g, 4 °C) wurde die Proteinkonzentration im Lysat nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt.

Die für die Immunpräzipitation verwendete Protein-G-Sepharose (50 µl pro Ansatz) wurde dreimal mit je 1 ml NP-40-Puffer gewaschen und anschließend abzentrifugiert. Die Gesamtzellextrakte (600 bis 800 µg Protein) wurden auf ein Gesamtvolumen von 1 ml eingestellt und zur Entfernung unspezifisch bindender Proteine für 1 h bei 4°C mit der Protein-G-Sepharose auf dem Schüttelrad inkubiert. Nach Zentrifugation (3 min, 4°C, 10000 x g) wurde der Überstand mit 2 µg des Antikörpers und 50 µl Protein-G-Sepharose auf

dem Schüttelrad bei 4°C über Nacht inkubiert. Hiernach wurden die gebildeten, über Protein-G-Sepharose immobilisierten, Immunkomplexe abzentrifugiert (1 min, 10000 x g, 4°C) und dreimal mit je 1 ml NP-40-Puffer gewaschen. Die Immunkomplexe wurden anschließend in 50 µl 1 x SDS-Puffer für 5 min gekocht und über ein SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden wie in **Kap. 3.7.3** beschrieben auf Nitrocellulose-Membranen transferiert und durch Western-Blotting analysiert.

### 3.10 Immunfluoreszenzanalysen

Für Immunfluoreszenzanalysen wurden Säugerzellen wie in **Kap 3.4.1** beschrieben transient transfiziert. 24 h nach Transfektionsbeginn wurden die Zellen einmal mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und mittels VT-Lösung von der Oberfläche der Zellkulturschale gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in DMEM-Vollmedium aufgenommen und abzentrifugiert (600 x g, RT, 2 min). Das Zellpellett wurde in DMEM-Vollmedium resuspendiert, die Zellzahl wurde bestimmt und eine Zellzahl von  $6 \times 10^5$  bis  $2,2 \times 10^6$  (je nach Zelllinien) in mit Glasdeckgläsern versehenen 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Nach weiteren 24 h wurde die Deckgläsern mit den angewachsenen Zellen durch kurzes Eintauchen in PBS (RT) gewaschen und die Zellen mit 3% Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurde das Fixativ entfernt und die fixierten Zellen dreimal für je 5 min mit PBS/100 mM Glycin gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1% Triton X-100 in PBS für 1-4 min permeabilisiert. Nach dreimaligem Waschen für je 5 min in PBS wurden die Zellen für 30 min in PBS/1% BSA inkubiert. Nach einstündiger Inkubation mit den Primärantikörpern (in PBS/1%BSA, Verdünnung je nach Antikörper 1:100 bis 1:1000) wurden die Zellen dreimal für je 10 min in PBS gewaschen. Die Inkubation mit Sekundärantikörpern (in PBS/1% BSA, Verdünnung 1:100) erfolgte für 60 min. Nach dreimaligem Waschen in PBS für je 10 min wurden die Zellen zur DNA-Färbung mit Hoechst 33342 (1:2000) für 10 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden nach zweimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 min in Mowiol eingedeckt. Die anschließenden Immunfluoreszenzanalysen wurden mit einem Laser-Scan-Mikroskop der Firma Zeiss durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

Das Adenovirus-Wirtszell-System ist ein ideales Modell, um die molekularen Mechanismen der Genregulation aufzuklären. Die Funktionen der Proteine der adenoviralen E1A-Region sind für die Expression aller anderen viralen Gene essentiell und modulieren zudem die Expression spezifischer zellulärer Gene, um eine effiziente Replikation des viralen Genoms zu gewährleisten. Da E1A-Proteine keine sequenzspezifische DNA-Bindeaktivität besitzen vermitteln sie ihre genregulatorischen Funktionen über die direkte Interaktion mit einer Vielzahl von zellulären Faktoren (siehe **Kap. 1.3**). Durch diese Interaktionen beeinflussen E1A-Proteine zelluläre Prozesse, wie die Zellzykluskontrolle, die Differenzierung, die Apoptose und die onkogene Transformation.

Obwohl zu Beginn meiner Untersuchungen zahlreiche zelluläre Faktoren beschrieben waren, die mit funktionellen Domänen (CR1-CR3, N-Terminus) der E1A-Proteine interagieren, ist anzunehmen, dass bis heute nicht alle E1A-bindenden Proteine identifiziert wurden. Daher ist es von besonderem Interesse unbekannte zelluläre Faktoren zu identifizieren, die spezifisch mit der konservierten Region 2 (CR2) und/oder dem Spacer (S) der adenoviralen E1A-Region interagieren und somit möglicherweise in den Prozess der onkogenen Transformation involviert sind. Zudem könnten durch die Isolierung zellulärer Proteine, die mit der konservierten Region 3 (CR3) interagieren, neue Erkenntnisse in Bezug auf den CR3-abhängigen Aktivierungsprozess von Genen gewonnen werden.

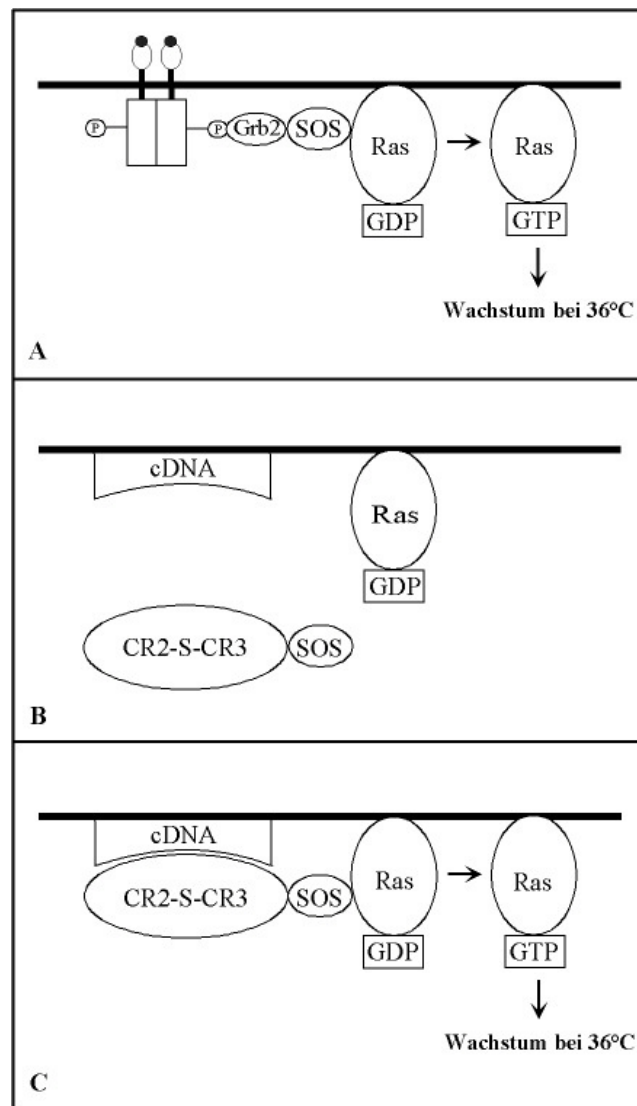
### 4.1 Identifikation eines die Region CR2-S-CR3 des Adenovirus-Serotyps 12 bindenden, zellulären Faktors mit Hilfe des Hefe „SOS-Two-Hybrid“-Systems

Zur Identifikation unbekannter zellulärer Faktoren, die mit CR2, dem Spacer oder CR3 der E1A-Region des Adenovirus-Serotyps 12 interagieren, wurden Protein-Protein-Bindungsstudien im Hefe „Two-Hybrid“-System durchgeführt. Da die konservierte Region 3 als starke Transaktivierungsdomäne fungiert konnte das klassische „Gal4-Two-Hybrid“-System (Chevray und Nathans, 1992) nicht eingesetzt werden, da hier die Expression des Indikorgens auf direktem Wege, d.h. ohne Interaktion des E1A-Proteins, mit einem Protein der cDNA-Expressionsbank aktiviert werden würde.

Für die Interaktionsstudien wurde in dieser Arbeit daher ein modifiziertes Hefesystem, das „SOS-Two-Hybrid“-System (Aaronheim *et al.*, 1997) verwendet (siehe **Kap. 3.3**). Es ermöglicht die Analyse spezifischer Protein-Protein-Interaktionen unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen in Hefezellen und erlaubt es zudem, Interaktionsanalysen mit transaktivierenden Proteindomänen als Köder durchzuführen. Im Gegensatz zum „Gal4-Two-Hybrid“-System wird hier nicht die Expression eines Indikators, sondern das selektive Wachstum bei nicht-permissiver Temperatur getestet. Dieses Hefesystem wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits erfolgreich für Interaktionsanalysen des E1A<sub>12S</sub>-Proteins mit dem Koaktivator p300 (Lipinski *et al.*, 1999) und mit den RI $\alpha$ - und RII $\alpha$ -Untereinheiten des PKA-Holoenzym (Fax *et al.*, 2001) eingesetzt.

Das Hefe „SOS-Two-Hybrid“-System basiert auf der Fähigkeit des humanen SOS-Proteins (hSOS; humaner Ras GEF, „guanyl nucleotid exchange factor“), den funktionellen *S. cerevisiae* Ras GEF (Cdc25) zu substituieren und somit die Proliferation der Zellen zu ermöglichen. Das hSOS-Protein ist in einem Komplex an Grb2 gebunden (siehe **Abb. 5 A**). Durch die Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren werden Phosphorylierungsstellen für Grb2 bereitgestellt, wodurch der Grb2-SOS-Komplex an die Zellmembran lokalisiert und der Ras-abhängige Signaltransduktionsweg aktiviert wird. Dies ermöglicht das Wachstum des temperatur-sensitiven Hefestammes *cdc25-2* bei selektiver Temperatur von 36°C.

Zur Identifikation Ad12 E1A-bindender zellulärer Faktoren wurde im Zuge meiner Arbeit ein defizientes SOS-Protein (Grb2-bindende Region ist deletiert) fusioniert an das Köderprotein CR2-S-CR3 in Hefezellen exprimiert (siehe **Abb. 5 B** und **C**). Der Selektionsmechanismus beruhte hier auf der spezifischen Interaktion zwischen dem Köder-Fusionsprotein (SOS-CR2-S-CR3) und Proteinen der cDNA-Expressionsbibliothek, die durch ein Myristilisierungssignal (MYR) an der Zellmembran verankert waren. Fand keine Protein-Protein-Interaktion zwischen dem Köder-Fusionsprotein und einem cDNA-Fusionsprotein statt, wurde der Ras-abhängige Signalkontrollweg nicht aktiviert, wodurch es zu keinem Wachstum der Hefezellen bei nicht-permissiver Temperatur von 36°C kam (siehe **Abb. 5 B**). Die Translokation des SOS-Fusionsproteins an die Zellmembran durch die spezifische Interaktion des Köderproteins mit einem MYR-cDNA-Fusionsprotein stellte den funktionellen Signaltransduktionsweg des SOS-defizienten *S. cerevisiae*-Mutantenstammes *cdc25-2* wieder her und ermöglichte so das Wachstum der Hefen bei selektiver Temperatur von 36°C (siehe **Abb. 5 C**).



**Abb. 5 Schematische Darstellung des Hefe „SOS-Two-Hybrid“-Systems.** (A) Das SOS-Protein ist an Grb2 gebunden. Durch Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren wird der Grb2-SOS-Komplex an der Zellmembran lokalisiert, wodurch der Ras-abhängige Signaltransduktionsweg aktiviert wird und den Hefezellen ein Wachstum bei nicht-permissiver Temperatur von 36°C ermöglicht. (B und C) Im SOS-defizienten *S. cerevisiae*-Mutantenstamm *cdc25-2* ist das SOS-Protein aufgrund der Deletion der Grb2-bindenden Region nicht membranverankert und kann somit seine Funktion im Signalkontrollweg nicht ausüben. (B) Findet keine Protein-Protein-Interaktion zwischen dem SOS-Köder-Fusionsprotein (SOS-CR2-S-CR3) und einem Protein der cDNA-Expressionsbank (fusioniert an Myristilisierungssignal, MYR) statt, wird der Ras-abhängige Signaltransduktionsweg nicht aktiviert. (C) Bei Interaktion des SOS-Köder-Fusionsproteins mit einem MYR-cDNA-Fusionsprotein wird die Funktion des SOS-Proteins im Signalweg durch Membranverankerung wiederhergestellt, wodurch der Ras-abhängige Signalkontrollweg aktiviert wird und den Hefen ein Wachstum bei selektiver Temperatur von 36°C ermöglicht.

Da gezeigt wurde, dass das konventionelle Hefe „SOS-Two-Hybrid“-System bei der Durchmusterung von Säuger-cDNA-Expressionsbibliotheken häufig zur Identifikation falsch-positiver Hefeklonen führt, wurde ein modifiziertes System eingeführt (Aronheim, 1997). In falsch-positiven Klonen werden cDNAs exprimiert, die für Proteine der Ras GTPase Familie

(Ras-Proteinen, Rit-Protein) kodieren. In Hefezellen ist mRas („mammalian Ras“) in der Lage, den Ras-abhängigen Signaltransduktionsweg „kurzzuschließen“. Die Notwendigkeit für ein an der Zellmembran verankertes SOS-Protein besteht somit nicht mehr. Dies resultiert, auch ohne spezifische Protein-Protein-Interaktion, in einem Hefewachstum bei selektiver Temperatur und somit in der Isolierung falsch-positiver cDNAs. Durch die Expression von mGAP („mammalian GTPase activating protein“) kann die Anzahl falsch-positiver Hefeklonen bei der Durchmusterung von Säugetier-cDNA-Expressionsbanken reduziert und die Effizienz des „SOS-Two-Hybrid“-Systems erhöht werden, da mGAP, im Gegensatz zu yGAP („yeast GTPase activating protein“) in der Lage ist, die mRas-Aktivität zu inhibieren.

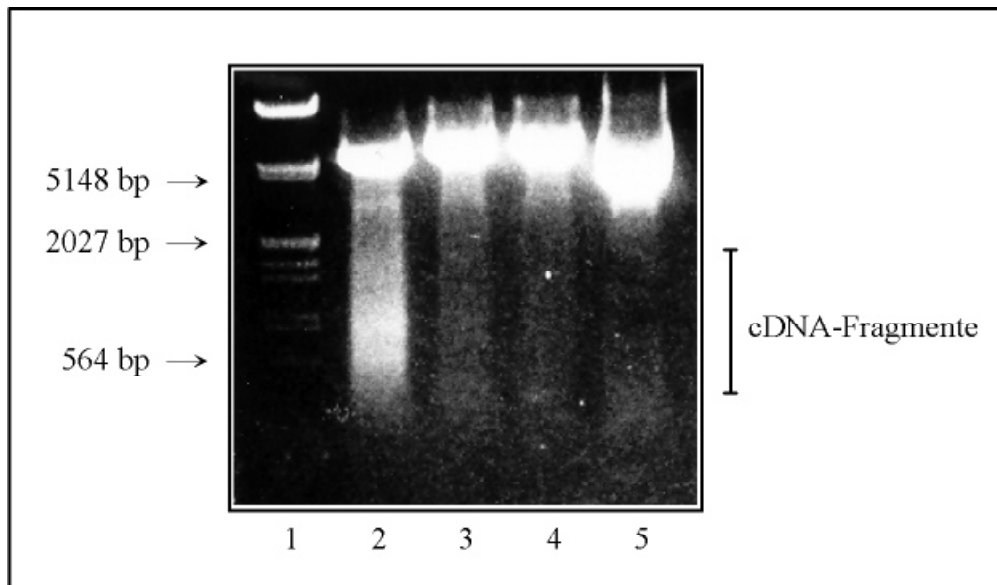
#### **4.1.1 Amplifikation und Charakterisierung der im Hefesystem eingesetzten Rattenhypophysen-cDNA-Expressionsbibliothek**

Die cDNAs der Expressionsbank wurden ursprünglich mit Hilfe von Random-Primern aus der aus Rattenhypophysen-Zellen isolierten mRNA generiert und nach anschließendem *EcoRI/XhoI*-Restriktionsendonukleaseverdau in allen drei Leserahmen in den Hefe-Expressionsvektor pYes2-MYR kloniert (Aaronheim *et al.*, 1997). Dieser Vektor exprimiert die klonierten cDNAs als Fusionsproteine mit einem N-terminalen Myristilisierungssignal.

Die Rattenhypophysen-cDNA-Expressionsbibliothek, die im Hefesystem eingesetzt werden sollte, wurde von mir zunächst amplifiziert, um ausreichend Material für die Interaktionsanalysen zur Verfügung zu haben. Hierzu wurden die  $2 \times 10^6$  unabhängigen cDNAs (im Hefe-Expressionsvektor pYes2-MYR) durch Elektroporation in Bakterien des *E. coli* Stammes DH10B transfiziert und die Bakterien anschließend vermehrt (siehe **Kap. 3.3.1**). Nach der Amplifikation wurde durch Titration der Anzahl der Bakterienklone ( $7,2 \times 10^6$ ) ermittelt. Da dies der 3,6-fachen Anzahl der ursprünglich klonierten, unabhängigen cDNAs entsprach, konnte davon ausgegangen werden, dass statistisch jede cDNA der Expressionsbibliothek amplifiziert wurde.

Die Plasmid-DNA wurde aus den Bakterien isoliert und durch Restriktionsanalysen charakterisiert (siehe **Abb. 6**). Da die Klonierung der cDNAs in den Hefe-Expressionsvektor pYes2-MYR über die Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen *EcoRI/XhoI* erfolgt war, wurde die Plasmid-DNA sowohl durch *EcoRI*- (siehe **Abb. 6**, Spur 3) als auch durch *XhoI*-Restriktionsendonukleaseverdau (siehe **Abb. 6**, Spur 4) linearisiert. Durch *EcoRI/XhoI*-Restriktionsendonukleaseverdau wurden die cDNA-Fragmente isoliert, wobei

eine erwartete mittlere Größe dieser Fragmente von ca. 500 bis 2000 bp bestätigt werden konnte (siehe **Abb. 6**, Spur 2).



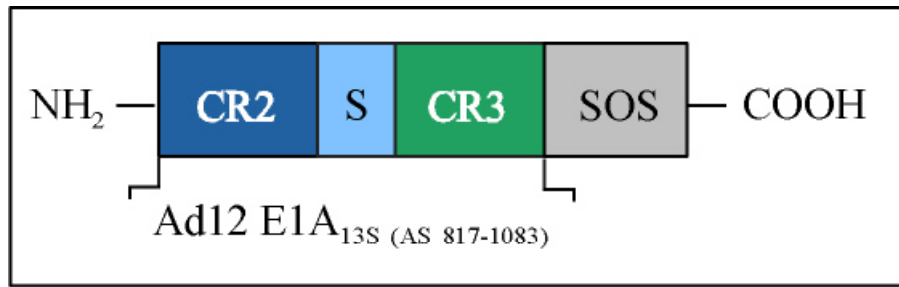
**Abb. 6 Charakterisierung der amplifizierten pYes2-MYR-cDNA-Expressionsbank-Plasmide durch Restriktionsendonukleaseverdau.** Durch *EcoRI/XhoI*-Restriktionsendonukleaseverdau wurden die cDNA-Fragmente isoliert. Eine erwartete mittlere Größe dieser Fragmente von 500 bis 2000 bp konnte bestätigt werden (Spur 2). Die Plasmid-DNA wurde sowohl durch *EcoRI*- (Spur 3) als auch durch *XhoI*-Restriktionsendonukleaseverdau (Spur 4) linearisiert. Nicht restringierte pYES2-MYR-cDNA-Plasmid-DNA (Spur 5). Größenstandard (Spur 1): *EcoRI/HindIII*-restringierte Bakteriophagen-Lambda-DNA.

#### 4.1.2 Durchmusterung der Rattenhypophysen-cDNA-Expressionsbank auf potentielle Interaktionspartner der Region E1A<sub>Ad12</sub>-CR2-S-CR3

Als Köder wurde ein Ad12 E1A<sub>135</sub>-DNA-Fragment mit den Regionen CR2-S-CR3 so in den Expressionsvektor pADNS-SOS kloniert, dass die entsprechenden E1A-Domänen in Hefezellen als Fusionsprotein mit einem C-terminalen SOS-Anteil exprimiert werden (siehe **Abb. 7**).

Hefen des temperatur-sensitiven *S. cerevisiae* Stammes *cdc25-2* wurden mit diesem Expressionsvektor (kodiert für das SOS-CR2-S-CR3-Fusionsprotein) und mit einem Expressionsvektor der für mGAP („mammalian GTPase activating protein“; im Hefe-Expressionsvektor pYes2, siehe **Kap. 4.1.1**) kodiert, stabil kotransformiert. Zur ersten Analyse möglicher Protein-Protein-Interaktionen wurden die kotransformierten Hefen mit dem Hefe-Expressionsvektor (pYes2-MYR-cDNA) transformiert, der die cDNAs der Expressionsbank als Fusionsproteine mit einem N-terminalen Myristilisierungssignal exprimiert.





**Abb. 7** Die Region CR2-S-CR3 (Aminosäuren (AS) 817-1083) des Adenovirus-Serotyps 12 wird im Hefesystem als Köder-Fusionsprotein mit einem C-terminalen SOS-Anteil exprimiert.

Mit Hilfe des modifizierten Hefe „SOS-Two-Hybrid“-Systems wurden insgesamt  $1,75 \times 10^7$  cDNA-Fusionsproteine auf eine Interaktion mit der SOS-E1A<sub>13S</sub>-Fusionsproteinmutante (SOS-CR2-S-CR3) hin untersucht.

Zur Selektion der cDNAs, die für ein Produkt kodieren das mit der E1A-Proteinsequenz interagiert, wurden von den Hefekolonien in den Interaktionsanalysen jeweils drei aufeinanderfolgende Replika-Plattierungen angefertigt und die Zellen bei selektiver Temperatur von 36°C inkubiert (siehe **Kap. 3.3.3**). Nach der ersten Selektion konnten 2168 und nach der zweiten Selektion 101 Hefeklone isoliert werden, die auf Selektionsagarplatten (YNB-(+)-Galactose) bei nicht-permissiver Temperatur wuchsen. Abschließend konnten in diesen ersten Interaktionsanalysen 19 Hefeklone isoliert werden, die nach dem dritten Selektionsschritt bei nicht-permissiver Temperatur von 36°C und in Abhängigkeit von Galactose ein Wachstum zeigten (siehe **Tab. 1**). Diese Hefen wurden als potentiell-positive Klone eingestuft, bei denen eine Interaktion des Köderproteins (CR2-S-CR3) mit einem cDNA-Bank-Fusionsprotein stattgefunden haben könnte.

Da jeder dieser 19 identifizierten Hefeklone mindestens drei Plasmide enthielt (pYes2-MYR-cDNA; pADNS-SOS-CR2-S-CR3; pYes2-mGAP), wurde die Plasmid-DNA aus den Zellen isoliert und zur Vereinzelung der Plasmide in elektrokompente Bakterien des *E. coli* Stammes XL2-blue transformiert. Nach Präparation der Plasmid-DNA aus jeweils zehn Bakterienkolonien wurde zur Differenzierung zwischen den Plasmiden und zur Identifikation der cDNA-Bank-Plasmide ein Restriktionsendonukleaseverdau durchgeführt (siehe auch **Kap. 4.2, Abb. 9**).

**Tab. 1** Mit Hilfe des Hefe „SOS-Two-Hybrid“-Systems konnten bei einer Gesamtzahl von  $1,75 \times 10^7$  durchmusterten Hefeklonen nach der ersten Replika-Plattierung 2168, nach der zweiten 101 und nach der dritten 19 Hefeklone selektiert werden.

Replika-Plattierung	Selektion von
1	2168 Hefekolonien
2	101 Hefekolonien
3	19 Hefekolonien

Nach diesen ersten Interaktionsanalysen im Hefesystem musste die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass falsch-positive Klone selektiert wurden. Hierzu gehörten Klone, in denen entweder **(A)** durch die Expression eines Proteins der Ras GTPase Familie - trotz Anwendung des modifizierten Hefe „SOS-Two-Hybrid“-Systems (pYes2-mGAP) - der Ras-abhängigen Signalkontrollweg „kurzgeschlossen“ wurde, wodurch für ein Hefewachstum bei selektiver Temperatur die Translokation des SOS-CR2-S-CR3-Fusionsproteins an die Zellmembran nicht essentiell war oder **(B)** ein Protein exprimiert wurde, das mit dem SOS-Anteil und nicht mit der CR2-S-CR3-Region des Köderproteins interagierte.

Zur Identifikation positiver Klone wurden daher die isolierten cDNA-Bank-Plasmide in einer zweiten Analyse auf Interaktion des Köder-Fusionsproteins mit den cDNA-Fusionsproteinen im Hefesystem überprüft (siehe **Kap. 3.3.3**).

Hefezellen des Stammes *cdc25-2* wurden mit jeweils einem der 19 isolierten pYes2-MYR-cDNA-Plasmide (exprimieren MYR-cDNA-Bank-Fusionsproteine) und **(A)** dem pADNS-SOS-CR2-S-CR3-Plasmid (Köder; exprimiert SOS-CR2-S-CR3-Fusionsprotein) oder **(B)** dem pADNS-SOS-Leervektor (exprimiert nur die SOS-Domäne) kotransformiert. Von diesen kotransformierten Hefezellen wurden je vier zufällig ausgewählte Hefeklone auf ein Wachstum bei selektiver Temperatur von 36°C getestet. Nach dieser zweiten Interaktionsanalyse im Hefe SOS-Two-Hybrid-System konnten Klone, die ausschließlich in Abhängigkeit von der Expression des Köderproteins und in Anwesenheit von Galactose bei nicht-permissiver Temperatur von 36°C wuchsen, als interaktions-positiv eingestuft werden.

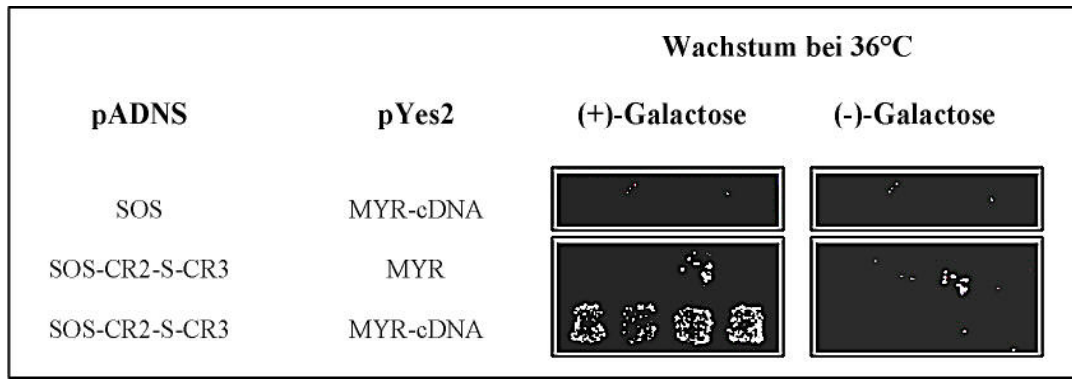
In diesen abschließenden Interaktionsstudien zeigten acht der kotransformierten Hefeklone kein Wachstum bei selektiver Temperatur von 36°C (siehe **Tab. 2**). Der Grund hierfür ist unklar, jedoch kann bei der Anwendung solcher Systeme nicht völlig

ausgeschlossen werden, dass zunächst Klone isoliert werden, die erst bei den abschließenden Interaktionsanalysen ausselektiert werden müssen. Zehn der Hefeklone zeigten keine Abhängigkeit ihres Wachstums von einer Expression des Köderproteins (SOS-CR2-S-CR3). Diese Hefen zeigten auch in den Kontrolltransformationen des pADNS-SOS-Leervektors (exprimiert nur das SOS-Protein) mit den pYes2-MYR-cDNA Plasmiden ein Wachstum bei nicht-permissiver Temperatur von 36°C. Hier handelte es sich folglich um falsch-positive Klone, in denen entweder der Ras-abhängigen Signalkontrollweg durch Expression eines mRas-Proteins „kurzgeschlossen“ wurde oder in denen der SOS-Anteil des Köderproteins mit den cDNA-Fusionsproteinen interagierte. Aus sechs dieser zehn Hefeklone wurde die Plasmid-DNA isoliert und die Nukleotidsequenz der cDNA bestimmt. Diese Sequenzanalysen und anschließende Homologievergleiche mit Computerdatenbanken bestätigten, dass es sich hierbei um cDNAs handelte, die für mRAS-Proteine kodieren (Daten nicht gezeigt).

**Tab. 2** In den abschließenden Interaktionsanalysen zeigten acht der kotransformierten Hefen kein Wachstum bei selektiver Temperatur von 36°C im Hefesystem. Zehn Hefeklone zeigten keine Abhängigkeit von der Expression des Köderproteins (CR2-S-CR3) bei ihrem Wachstum bei 36°C. Ein Hefeklon wuchs in Abhängigkeit von der Expression des Köderproteins (CR2-S-CR3) bei nicht-permissiver Temperatur von 36°C auf Selektionsagarplatten (YNB-(+)-Galactose).

Anzahl der kotransformierten Hefeklone	Wachstums bei selektiver Temperatur von 36°C
8	kein Wachstum
10	keine Abhängigkeit von der Expression des Köderproteins
1	Abhängigkeit von Galactose und der Expression des Köderproteins

In diesen abschließenden Interaktionsstudien konnte ein Hefeklon identifiziert werden, der bei nicht-permissiver Temperatur von 36°C auf Selektionsagarplatten (YNB-(+)-Galactose) und in Abhängigkeit von der Expression des Köderproteins (CR2-S-CR3) wuchs und somit alle Selektionsbedingungen erfüllte (siehe **Abb. 8**).



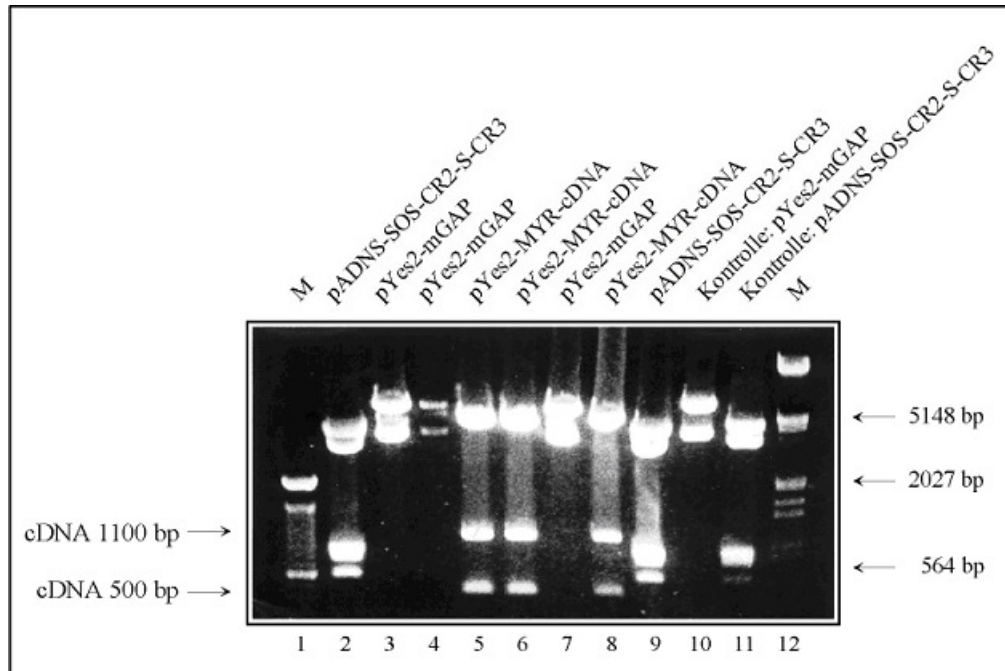
**Abb. 8 Das Köder-Fusionsprotein (SOS-CR2-S-CR3) interagiert mit einem Protein der cDNA-Expressionsbank im Hefe-„SOS-Two-Hybrid“-System.** Hefezellen des Stammes *cdc25-2* wurden mit dem isolierten pYes2-MYR-cDNA-Plasmid (exprimiert MYR-cDNA-Bank-Fusionsprotein) bzw. dem pYes2-MYR-Leervektor (exprimiert nur das Myristilisierungssignal) und dem pADNS-SOS-CR2-S-CR3-Plasmid (Köder; exprimiert SOS-CR2-S-CR3-Fusionsprotein) oder dem pADNS-SOS-Leervektor (exprimiert nur die SOS-Domäne) wie angegeben kotransformiert. Die Zellen wurden auf YNB<sup>-Ura/-Leu</sup>-Glukose Platten bei nicht selektiver Temperatur von 25°C für 3-4 Tage inkubiert. Danach erfolgte eine Plattierung von je vier Hefeklonen jedes Transformationsansatzes auf YNB-Glukose Platten und eine weitere Inkubation für 3 Tage bei 25°C. Anschließend wurden Replika-Plattierungen auf YNB<sup>-Ura/-Leu</sup>-(+)-Galactose und YNB<sup>-Ura/-Leu</sup>-(-)-Galactose Platten angefertigt und die Hefezellen für weitere 3 Tage bei nicht-permissiver Temperatur von 36°C inkubiert.

## 4.2 Charakterisierung der mit Hilfe des Hefe „SOS-Two-Hybrid“-Systems identifizierten cDNA

Die erste Charakterisierung der identifizierten cDNA, die für ein Produkt kodiert das im Hefesystem mit der E1A-Proteinsequenz (CR2-S-CR3) interagiert, erfolgte durch Restriktionsanalysen. Zur Vereinzelung und Differenzierung der drei in jedem Hefeklon enthaltenen Plasmide (pYes2-MYR-cDNA, pADNS-SOS-CR2-S-CR3 und pYes2-mGAP) wurde die isolierte Plasmid-DNA in Bakterien transformiert und anschließend, aufgrund der Klonierung der Expressionsbank (siehe **Kap. 4.1.2**), einem *EcoRI/XhoI*-Restriktionsendonukleaseverdau unterzogen. Das pYes2-mGAP Plasmid (siehe **Abb. 9**, Spur 10) und das Köderplasmid pYes2-SOS-CR2-S-CR3 (siehe **Abb 9**, Spur 11) wurden in zwei zusätzlichen, getrennten Ansätzen restringiert.

Wie aus **Abb. 9** ersichtlich, ergaben die Restriktionsanalysen eine Größe der cDNA mit einer Gesamtlänge von ca. 1600 bp (Spuren 5, 6, 8). Da der Verdau des cDNA-Plasmids zusätzlich zum Vektor-Fragment zwei Fragmente (ca. 1100 und 500 bp) zeigte, musste man von einer internen Schnittstelle in der cDNA (*EcoRI*- oder *XhoIII*-Schnittstelle) ausgehen. Um dies zu überprüfen, wurden weitere Restriktionsanalysen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der durch diese Analysen erhaltenen Ergebnisse konnte ich eine interne *EcoRI*-Schnittstelle in der cDNA nachgewiesen.

In den Spuren 3, 4 und 7 konnte das isolierte und restringierte pYes2-mGAP-Plasmid identifiziert werden. Das Köderplasmid pADNS-SOS-CR2-S-CR3) wurde in den Spuren 2 und 9 identifiziert.



**Abb. 9 Die Analyse durch *EcoRI/XhoI*-Restriktionsendonukleaseverdau ergab eine Gesamtgröße der isolierten cDNA von ca. 1600 bp.** In den Spuren 5, 6 und 8 konnte das restringierte pYes2-MYR-cDNA-Bank Plasmid identifiziert werden. Zur Differenzierung wurde die Plasmide pYes2-mGAP (Spur 10) und pADNS-SOS-CR2-S-CR3 (Spur 11) ebenfalls durch *EcoRI/XhoI* restringiert. Die restlichen Spuren lassen sich somit je einem der Plasmide zuordnen. Spur 1: M: Größenstandard (100 bp Leiter); Spur 12: M: Größenstandard (*EcoRI/HindIII*-verdaute Bakteriophagen-Lambda-DNA).

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Nukleotidsequenz der cDNA bestimmt. Die anschließenden Homologievergleiche der cDNA-Nukleotidsequenz mit verschiedenen Computerdatenbanken (GenBank, SwissProt) zeigten, dass die isolierte Rattenhypophysen-cDNA eine 97%ige Homologie zu dem humanen sog. REC/REAM-Gen („reduced expression in cancer/reduced expression associated with metastasis“) aufweist. Dieses Gen, das von Oyama und Mitarbeitern identifiziert und erstmalig beschrieben wurde (Oyama *et al.*, 2000), ist in der Region p21.3-22 des humanen Chromosom 8 lokalisiert und besteht aus 13 Exons unterschiedlicher Länge. Erste von dieser Arbeitsgruppe veröffentlichte Daten lassen vermuten, dass dieses Gen in die Tumorsuppression involviert sein könnte, da seine Expression in der Mehrzahl der untersuchten humanen Primärtumoren des Dickdarms sowie in Lebermetastasen signifikant reduziert ist.

Aufgrund der hohen Homologie der Nukleotidsequenz zu der von Oyama und Mitarbeitern identifizierten humanen REC/REAM-cDNA wird die von mir isolierte Ratten-cDNA im Folgenden als **r-REC** (rat-REC) bezeichnet.

### 4.3 Bestimmung der Expression und Größe der nativen r-REC mRNA in Ratten- und Humangeweben

Aufgrund der Daten, die durch die Analyse der Nukleotidsequenz erhalten wurden, musste davon ausgegangen werden, dass mit Hilfe des Hefesystems nur die trunkierte r-REC-cDNA isoliert wurde. Die Bestimmung der Größe der nativen r-REC mRNA sollte wichtige Informationen für die spätere Isolierung der Vollängen-cDNA liefern.

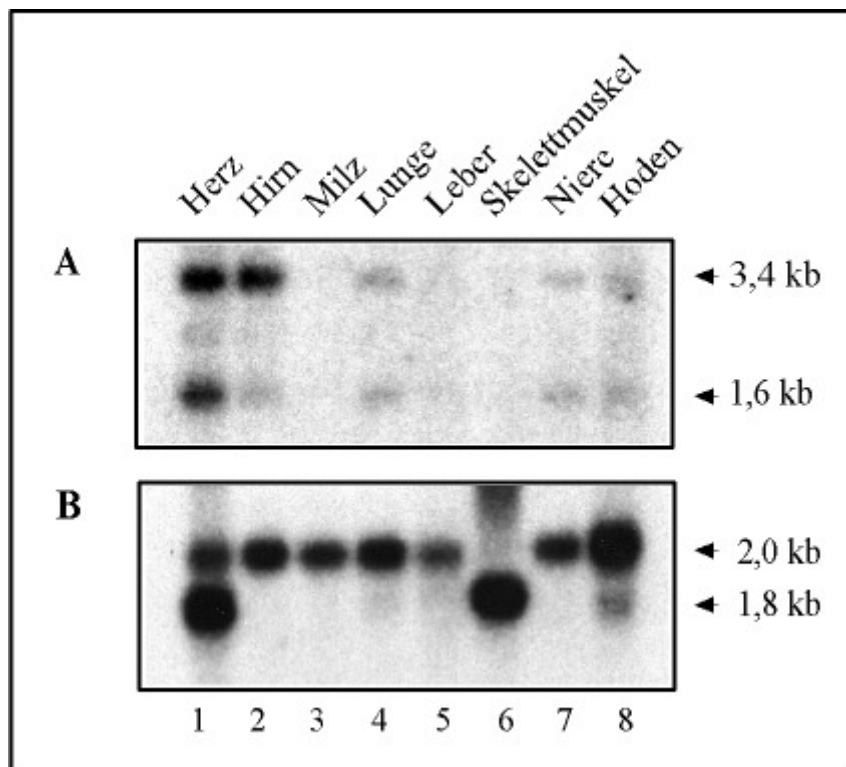
Um die Größe der nativen r-REC mRNA zu ermitteln und die Expression in verschiedenen Geweben zu analysieren wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Da die im Hefesystem verwendete cDNA-Expressionsbibliothek aus der aus Rattenhypophysen-Zellen isolierten mRNA generiert wurde, wurde zunächst ein „Rat Multiple Tissue Northern“-Blot eingesetzt. Die auf der Membran gebundenen denaturierten RNAs stammen aus den Rattengeweben Herz, Hirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Hoden. Die Membran wurde mit einer radioaktiv-markierten DNA-Sonde (Nukleotid 46-495 der isolierten cDNA, siehe auch **Abb. 12**) inkubiert. Nach der Hybridisierung konnten die entstandenen DNA-RNA-Hybride lokalisiert und die spezifischen Transkripte nachgewiesen werden.

Wie in **Abb. 10 A** gezeigt, wurden durch die Hybridisierung mit der spezifischen cDNA-Probe zwei Transkripte mit einer Größe von 1,6 kb und 3,4 kb in den Rattengeweben Herz (Spur 1), Hirn (Spur 2), Lunge (Spur 4), Niere (Spur 7) und Hoden (Spur 8) identifiziert. Die Tatsache, dass in diesen Geweben zwei mRNAs unterschiedlicher Größe exprimiert werden, lässt darauf schließen, dass **(a)** zwei Gene mit hoch-homologen Nukleotidsequenzen in der Ratte existieren, **(b)** durch alternatives Spleißen zwei mRNAs von einem Gen generiert werden oder **(c)** ein Gen von zwei verschiedenen Promotoren transkribiert wird.

Durch die Northern Blot Analyse ließen sich zudem quantitative Aussagen über die Transkriptmenge treffen. Aus **Abb. 10 A** ist ersichtlich, dass die Expression der mRNA sowohl im Herz- als auch im Hirngewebe der Ratte besonders hoch ist (Spuren 1 und 2). Da auch bei einer Überexponierung des Röntgenfilms weder in der Milz (Spur 3) noch in der Leber (Spur 5) oder im Skelettmuskel (Spur 6) ein Hybridisierungssignal nachzuweisen war,

muss davon ausgegangen werden, dass die mRNA in diesen Geweben nicht oder nur unterhalb der Nachweisgrenze exprimiert wird.

Zur Kontrolle wurde die Membran nach Entfernung der spezifischen DNA-Sonde mit einer radioaktiv-markierten, humanen  $\beta$ -Actin cDNA-Sonde inkubiert (siehe **Abb. 10 B**). Nach der Hybridisierung sollte nach Angaben des Herstellers (Clontech) in allen Geweben ein Transkript mit einer Größe von 2,0 kb und im Herz- (Spur 1) und Skelettmuskelgewebe (Spur 6) ein zusätzliches Transkript mit einer Größe von 1,8 kb nachgewiesen werden können. Da in der Skelettmuskulatur jedoch kein Hybridisierungssignal in der Größe von 2,0 kb identifiziert werden konnte, lassen die erhaltenen Ergebnisse dieser Spur des Blots keine eindeutigen Aussagen zu.



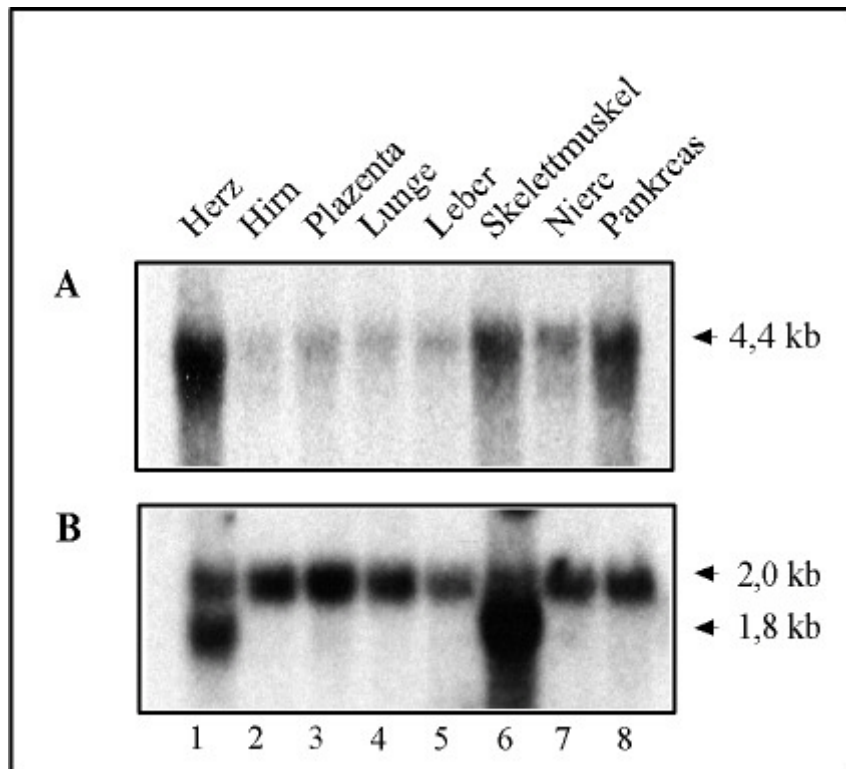
**Abb. 10 Northern Blot Analyse zur Bestimmung der Größe der nativen r-REC mRNA und der Expression in verschiedenen Rattengeweben.** (A) Durch die Hybridisierung mit der radioaktiv-markierten r-REC spezifischen DNA-Probe (Nukleotid 46-495) wurden zwei Transkripte mit einer Größe von 1,6 kb und 3,4 kb in den Rattengeweben Herz (Spur 1), Hirn (Spur 2), Lunge (Spur 4), Niere (Spur 7) und Hoden (Spur 8) nachweisbar. In den Geweben Milz (Spur 3), Leber (Spur 5) und Skelettmuskel (Spur 6) waren auch bei Überexponierung des Röntgenfilms keine Hybridisierungssignale nachweisbar. (B) Kontrollhybridisierung mit einer radioaktiv-markierten, humanen  $\beta$ -Actin-cDNA-Sonde.

Da die menschliche Zelle der natürliche Wirt humanpathogener Adenoviren ist, stellte sich die Frage, ob und in welcher Größe eine äquivalente mRNA in menschlichen Geweben synthetisiert wird. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde ein „Human Multiple Tissue Northern“ Blot eingesetzt und die Membran mit der radioaktiv-markierten, spezifischen DNA-Sonde (Nukleotid 46-495 der isolierten cDNA, siehe auch **Abb. 12**) inkubiert.

Die Analyse der DNA-RNA-Hybride ergab, dass in allen hier untersuchten humanen Geweben (Herz, Hirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas) eine mRNA mit einer Größe von 4,4 kb exprimiert wird (siehe **Abb. 11 A**). Zudem ist erkennbar, dass die Expression der mRNA im Herz (Spur 1), im Skelettmuskel (Spur 6) und im Pankreas (Spur 8) deutlich höher ist als in den anderen analysierten Geweben. Die hohe Expression im humanen Herzwert korreliert hier mit der starken Expression im Gewebe des Rattenherzens (siehe **Abb. 10 A**), eine Korrelation zu den anderen analysierten Geweben der Ratte ist jedoch nicht erkennbar.

Auch in diesen Analysen wurde die Membran nach der Entfernung der spezifischen DNA-Sonde mit einer radioaktiv-markierten, humanen  $\beta$ -Actin cDNA-Sonde inkubiert (siehe **Abb. 11 B**). Die erwartete Expression der mRNA in einer Größe von 2,0 kb in allen analysierten humanen Geweben und zusätzlich in einer Größe von 1,8 kb im Herz- und im Skelettmuskelgewebe (Spuren 2 und 6) konnte in diesem Kontrollexperiment nachgewiesen werden.





**Abb. 11 Northern Blot Analyse zur Bestimmung der Größe der nativen mRNA und der Expression in verschiedenen humanen Geweben.** (A) Die Hybridisierung mit der radioaktiv-markierten cDNA-spezifischen Probe (Nukleotid 46-495) zeigte ein Transkript mit einer Größe von 4,4 kb in allen analysierten humanen Geweben (Herz (Spur 1), Hirn (Spur 2), Plazenta (Spur 3), Lunge (Spur 4), Leber (Spur 5), Skelettmuskel (Spur 6), Niere (Spur 7) und Pankreas (Spur 8)). (B) Kontrollhybridisierung mit einer radioaktiv-markierten, humanen  $\beta$ -Actin-cDNA-Sonde.

#### 4.4 Identifikation der vollständigen Kodierungssequenz der r-REC cDNA

Im Gegensatz zu der von Oyama und Mitarbeitern beschriebenen humanen REC-cDNA, welche die gesamte kodierende Sequenz enthält, musste aufgrund der Nukleotidsequenz und der Northern Blot Analysen angenommen werden, dass der von mir isolierte Ratten-REC-cDNA im N-terminalen Bereich kodierende Sequenzen fehlten. Für die nachfolgenden Experimente war es jedoch von entscheidender Bedeutung, die vollständige kodierende Sequenz der Ratten cDNA zu isolieren, da nur so sichergestellt ist, dass das r-REC-Protein effizient exprimiert wird. Die Kriterien, die für die Festlegung vollständiger cDNA-Sequenzen erfüllt werden sollten, sind z.B. ein im richtigen Kontext stehendes ATG-Kodon (ANNATGG, Kozak-Sequenz) und ein im selben Leseraster dazu in 5'-Richtung gelegenes Stopkodon (als Übersicht siehe Kozak, 1996).

Da in den Northern Blot Experimenten (siehe **Kap. 4.3**) gezeigt wurde, dass die Expression der Ratten-mRNA u.a. im Gewebe des Herzens besonders hoch ist, wurde von mir zunächst die Gesamt-RNA aus Rattenherzen isoliert. Die gesamte kodierende Region konnte anschließend mit Hilfe der RACE-PCR-Technik und eines modifizierten PCR-Programmes (in Kooperation mit Ulrich Frey, Institut für Pharmakologie, Universitätsklinikum Essen) identifiziert werden. Aufgrund der Tatsache, dass in Rattengeweben zwei Transkripte unterschiedlicher Größe nachgewiesen werden konnten, wovon das kleine Transkript (1,6 kb) die vollständige kodierende Region enthält (siehe **Kap. 4.3**), wird die Volllänge der von mir isolierten cDNA im Folgenden als **r-SREC** („rat small REC“) bezeichnet.

Zur Erfassung der vollständigen kodierenden Region der r-SREC-cDNA wurden DNA-Sequenzanalysen durchgeführt, wobei die Bestimmung der Nukleotidsequenz mit Vektor-spezifischen Primern sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung erfolgte.

Ein vermutliches ATG-Initiationskodon wurde bei Nukleotid 244 identifiziert (siehe **Abb. 12**). Dieses putative Initiationskodon ist von einer sog. Kozak-Sequenz (Consensus-Motiv ANNATGG) umgeben. Zudem wurde in 5'-Richtung im gleichen Leseraster ein Stopkodon (nt 22) identifiziert, womit dieses ATG als Initiationskodon und Beginn des Leserasters verifiziert werden konnte. Ein Stopkodon (TAA) wurde bei Nukleotid 1342 identifiziert, woraus sich eine Größe des offenen Leserasters 366 Aminosäuren (1098 Nukleotide) ergab. Die vollständige kodierende Region der r-SREC cDNA konnte somit isoliert werden (siehe **Abb. 12**).

9	18	27	36	45	54					
ATT GCC TTC GTC CTC CGC CTC	<b>TGA</b>	GCC GCC GCC TCA GCC CGG CGG AGC AGC GGG								
63	72	81	90	99	108					
AGT CCG CGG CGC CCG CTC GCC GCC GCG GGA TGG GGA GCT AGC GCC ACG GCG GCC										
117	126	135	144	153	162					
GCG GTG GCC GCA GCA CAG CCG GCC GCC GCC CCC GGG CCT GTC CCG CCG GGT GCT										
171	180	189	198	207	216					
CCG GGA GCC CCG AGC CCG GCC CCG AGC CAG GCC CGC GGG CGG CGG CGG CGG AGG										
225	234	243	252	261	270					
AGC TGG GCA GGT GTA TGC GGC TGG AAG	<b>ATG</b>	GCG CCC TCG GGC CCC GGT GGC GTG								
		M	A	P	S	G	P	G	G	V
279	288	297	306	315	324					
AGG CGG CGG TGC CGG CGG GTG CTC TAC TGG ATC CCT GTG GTG TTC ATC AGC TTG										

R R R C R R V L Y W I P V V F I S L  
  
 333 342 351 360 369 378  
 CTT CTG GGC TGG TCC TAC TAT GCT TAC GCG ATC CAG CTG TGC ATA GTG TCC ATG  
L L G W S Y Y A Y A I Q L C I V S M  
  
 387 396 405 414 423 432  
 GAA AAC ATT GGT GAA CAA GTT GTG TGC CTC ATG GCT TAT CAT CTA CTT TTC GCA  
 E N I G E Q V V C L M A Y H L L F A  
  
 441 450 459 468 477 486  
 ATG TTT GTC TGG TCA TAC TGG AAA ACC ATT TTT ACA TTG CCC ATG AAT CCT TCA  
M F V W S Y W K T I F T L P M N P S  
  
 495 504 513 522 531 540  
 AAA GAA TTC CAT CTC TCT TAT GCA GAG AAA GAA TTG CTG GAG AGA GAG CCA AGA  
 K E F H L S Y A E K E L L E R E P R  
  
 549 558 567 576 585 594  
 GGA GAA GCC CAT CAG GAA GTT CTG AGG CGA GCA GCC AAA GAC CTT CCC ATC TAC  
 G E A H Q E V L R R A A K D L P I Y  
  
 603 612 621 630 639 648  
 ACC AGG ACC ATG TCC GGC GCG ATC CGA TAT TGT GAC AGA TGC CGA CTT ATA AAG  
 T R T M S G A I R Y C D R C R L I K  
  
 657 666 675 684 693 702  
 CCA GAC CGC TGC CAT CAC TGT TCC GTC TGT GAT AAA TGT ATT TTG AAG ATG GAC  
P D R C H H C S V C D K C I L K M D  
  
 711 720 729 738 747 756  
 CAT CAT TGC CCA TGG GTG AAC AAT TGT GTT GGA TTT TCA AAT TAT AAA TTC TTC  
H H C P W V N N C V G F S N Y K F E  
 765 774 783 792 801 810  
 CTC CTT TTC TTG GCT TAC TCT CTG CTG TAC TGC CTT TTC ATT GCT GCT ACA GAT  
L L F L A Y S L L Y C L F I A A T D  
  
 819 828 837 846 855 864  
 TTA CAG TAT TTT ATC AGA TTT TGG ACA AAT GGT CTC CCT GAT ACT CAA GCC AAG

L Q Y F I R F W T N G L P D T Q A K

873 882 891 900 909 918  
TTC CAT ATT ATG TTT TTA TTC TTT GCT GCA GCT ATG TTT TCT GTC AGC TTG TCC  
F H I M F L F F A A A M F S V S L S

927 936 945 954 963 972  
TCT CTT TTT GGT TAT CAT TGC TGG CTA GTC AGC AAA AAT AAA TCT ACA TTA GAG  
S L F G Y H C W L V S K N K S T L E

981 990 999 1008 1017 1026  
GCA TTC AGA AAT CCA GTA TTT AGA CAT GGA ACA GAT AAG AAC GGA TTC AGC TTG  
A F R N P V F R H G T D K N G F S L

1035 1044 1053 1062 1071 1080  
GGT TTC AGT AAA AAC ATG CGA CAA GTT TTT GGC GAT GAG AAG AAG TAT TGG CTG  
G F S K N M R Q V F G D E K K Y W L

1089 1098 1107 1116 1125 1134  
TTA CCA ATA TTT TCA AGT CAA GGT GAT GGC TGT TCC TTT CCA ACT TGC CTT GTT  
L P I F S S Q G D G C S F P T C L V

1143 1152 1161 1170 1179 1188  
AAC CAG GAT CCT GAA CAA CCT TCC ACT CCT GCA GGA CTA AAT TCA ACA GCG AAA  
N Q D P E Q P S T P A G L N S T A K

1197 1206 1215 1224 1233 1242  
AAT CCT GAA AAC CAT CAG TTT CCT GCA AAG CCG TTG AGA GAG TCA CAG AGC CAC  
N P E N H Q F P A K P L R E S Q S H

1251 1260 1269 1278 1287 1296  
CTC CTT ACG GAT TCT CAG ACC TGG ACA GAG AAC AGT TCA AAC TCC GGG AGA TGC  
L L T D S Q T W T E N S S N S G R C

1305 1314 1323 1332 1341 1350  
AAA GCC GGT ATG AGC AAC CCT GCA TTA ACT ATG GAG AAC GAG ACT **TAA** CTC TAC  
K A G M S N P A L T M E N E T \*

```

      1359      1368      1377      1386      1395      1404
AAT CAA AAT AAA ACC ACT CTT GTA AAG TAC CAA GGC TGT GGA AGA CTG GAA CAA

      1413      1422      1431      1440      1449      1458
GCT TCC AAT TGG ATG GCA CCA TTG GCC AAT TGT CCC TTT GGC TAA ATA TGC GAA

      1467      1476      1485      1494      1503      1512
TTT TGT CTT CAG TGA TGG GGA TCA AAC ACA GCA CTA TCA AGA ATT TCA AGT AAT

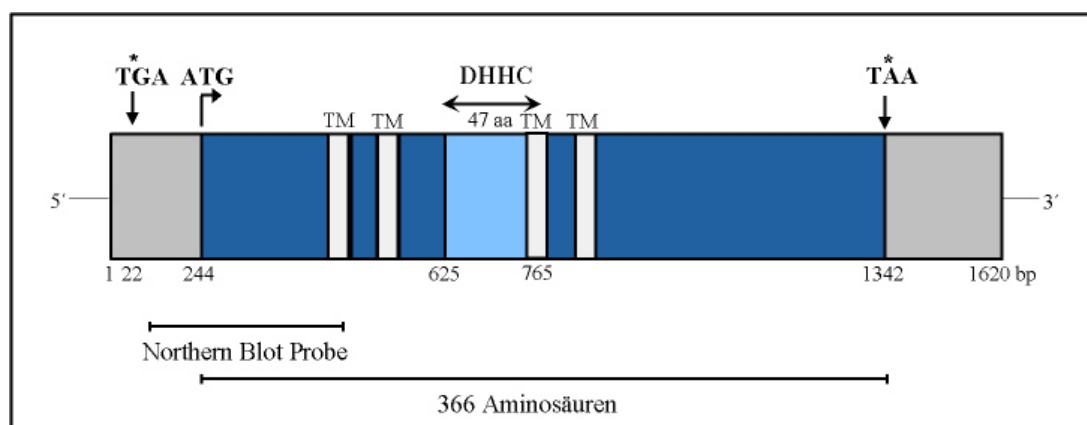
      1521      1530      1539      1548      1557      1566
CAC CAA ACT GAT GCT TAA AAC AGA ACA CTG TTT ATT CCA ATA TAT AGA CTT CTG

      1575      1584      1593      1602      1611      1620
TAA CTA ATA CAA ATT ACT ATT AAC CTT CAA AAG TAA TTA AAA AAA TAT TTT TTG

```

**Abb. 12 Vollständige Kodierungssequenz der r-SREC cDNA.** Die Nukleotidsequenz und die Aminosäuresequenz (Einbuchstabencode) sind angegeben. Die Zahlen beschreiben die Positionen der Nukleotide. Das Initiationskodon (ATG; nt 244) und das Stopkodon (TAA; nt 1342) sind rot dargestellt, das Stopkodon ist zusätzlich durch einen Stern gekennzeichnet. Das in 5'-Richtung im Leseraster gelegene Stopkodon (TGA; nt 22) ist ebenfalls rot dargestellt. Die DHHC-Domäne (nt 625-766) ist in der Aminosäuresequenz blau dargestellt, vier putative Transmembran-Regionen sind unterstrichen (Erläuterungen hierzu siehe nächster Abschnitt).

Der strukturelle Aufbau der r-SREC-cDNA ist in **Abb. 13** dargestellt. Die Nukleotide 625-766 kodieren für eine Cystein-reiche Domäne, die sog. DHHC-Domäne (Einbuchstabencode; Asp-His-His-Cys). Homologievergleiche mit verschiedenen Computerdatenbanken (GenBank, SwissProt) haben gezeigt, dass die Aminosäuresequenz dieser Domäne hoch-konserviert ist, die genaue Funktion dieser Domäne ist jedoch nicht bekannt. Durch Computeranalysen (PSORTII, SMART) konnten zudem vier putative Transmembran-Regionen (TM) identifiziert werden.

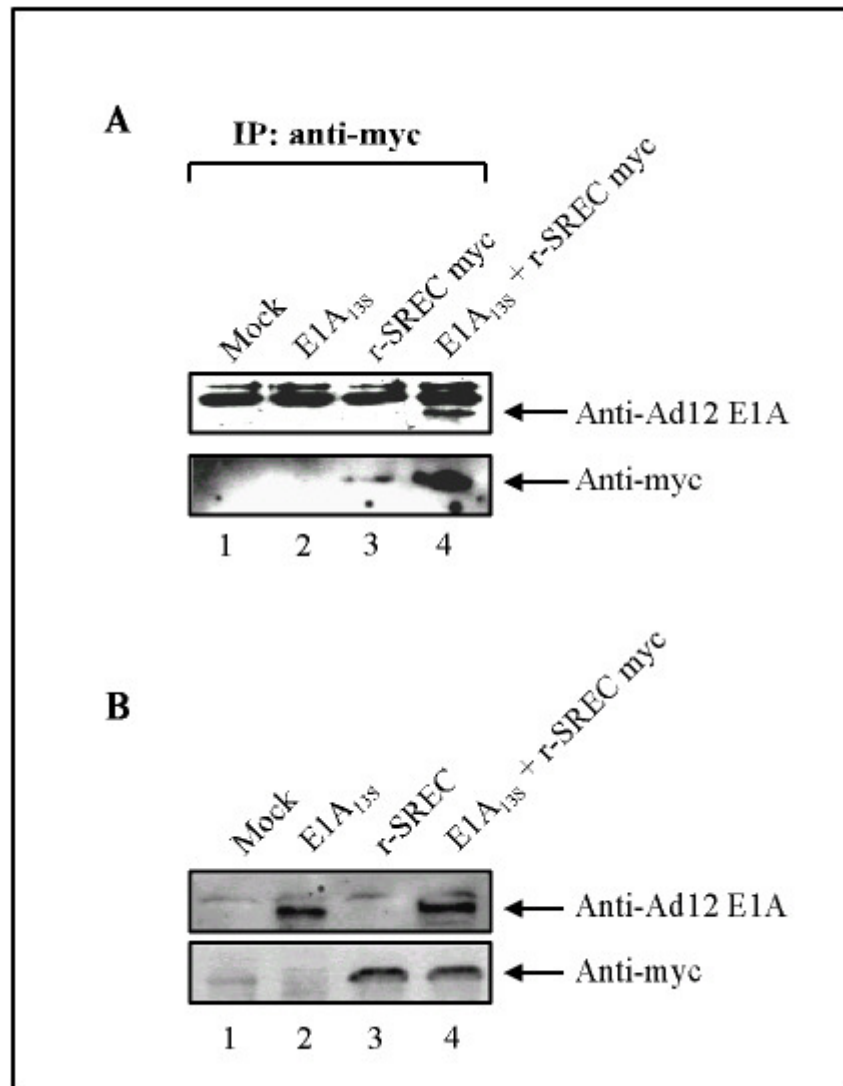


**Abb. 13 Struktureller Aufbau der isolierten r-SREC-cDNA.** Das ATG-Initiationskodon konnte bei Nukleotid 244 identifiziert werden, in 5'-Richtung wurde im gleichen Leseraster ein Stopkodon (nt 22) identifiziert. Das Stopkodon (TAA) wurde bei Nukleotid 1342 identifiziert. Hieraus ergibt sich ein offener Leseraster von 366 Aminosäuren. Die Nukleotide 625-765 kodieren für eine sog. DHHC-Domäne (Einbuchstabencode). Vier putative Transmembran-Regionen (TM) sind als hellgraue Rechtecke gekennzeichnet. Für die Northern Blot Experimente (siehe **Kap. 4.3**) wurde der Bereich der Nukleotide 46-495 als spezifische Probe eingesetzt.

## 4.5 Das r-SREC-Protein interagiert mit adenoviralen E1A-Proteinen in Säugerzellen

Durch die bisherigen Protein-Protein-Interaktionsanalysen im Hefesystem konnte ich belegen, dass das E1A-Protein mit dem r-SREC-Protein interagiert. Um erste Hinweise auf eine mögliche physiologische Relevanz bezüglich dieser Bindung in Säugerzellen zu erhalten wurden Immunpräzipitationen durchgeführt.

Hierfür wurden zunächst COS7-Zellen mit Expressionsvektoren für das Ad12 E1A<sub>13S</sub>-Protein und/oder für das myc/his-r-SREC-Fusionsprotein (exprimiert r-SREC als Fusionsprotein mit einem C-terminalen myc- und his-Epitop) transient transfiziert. Nach Präparation der Gesamtzellextrakte wurde r-SREC mit einem gegen das myc-Epitop des Fusionsproteins gerichteten Antikörper präzipitiert. Die gebildeten Immunkomplexe wurden nachfolgend im Western Blot mit einem anti-Ad12 E1A-Antiserum analysiert. Wie in **Abb. 14 A** dargestellt, führte die Immunpräzipitation mit dem gegen das myc-Epitop des r-SREC-Fusionsproteins gerichteten Antikörper zu einer effizienten Kopräzipitation des adenoviralen Proteins (Spur 4). Dagegen war kein E1A<sub>13S</sub>-spezifisches Signal in den Immunkomplexen aus Kontroll-transfizierten Zellen nachweisbar (Spur 2). Die Kopräzipitation des Ad12 E1A<sub>13S</sub>-Proteins mit dem anti-myc-Antikörper bestätigte somit die Interaktion zwischen E1A und r-SREC in transient transfizierten COS7-Zellen.

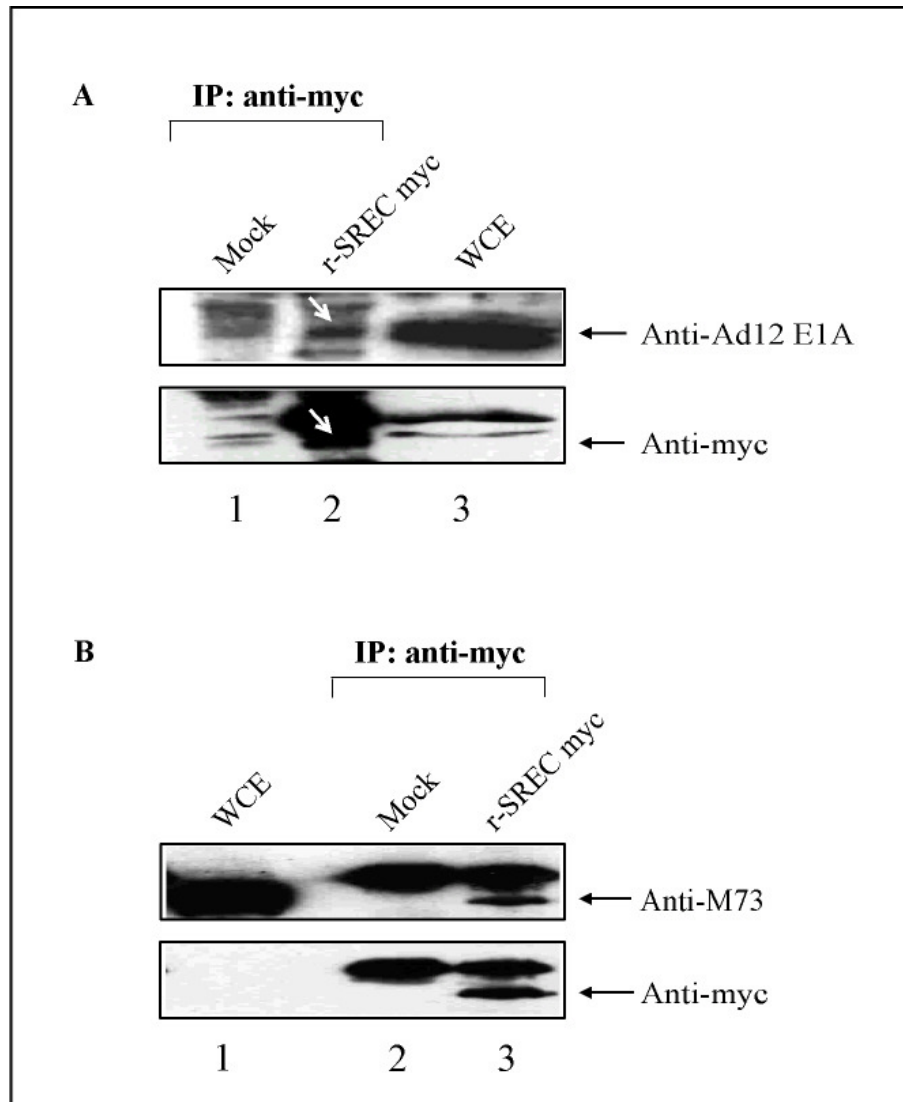


**Abb. 14 Das r-SREC-Protein interagiert mit dem E1A<sub>13S</sub>-Protein in Säugerzellen.** (A) COS7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für das Ad12 E1A<sub>13S</sub>-Protein und für ein myc-Epitop gekoppeltes r-SREC-Protein wie angegeben transfiziert. Die Zellen wurden nach 48 h lysiert und die Gesamtzellextrakte mit einem anti-myc-Antikörper inkubiert. Gebildete Immunkomplexe wurden auf Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot Analysen mit den angegebenen Antikörpern analysiert. (B) Western-Blot-Analysen der für die Immunpräzipitationen eingesetzten Gesamtzellextrakte bestätigten die Expression des E1A<sub>13S</sub>-Proteins und des r-SREC-Fusionsproteins in den transfizierten Zellen.

Die effiziente Eigenpräzipitation des r-SREC-Proteins konnte mit einem gegen das myc-Epitop des Fusionsproteins gerichteten Antikörper und nachfolgenden Western Blot Analysen mit einem anti-myc-Antiserum nachgewiesen werden (siehe **Abb. 14 A**, Spur 3 und 4). Zudem bestätigten Western-Blot-Analysen der für die Immunpräzipitationen eingesetzten Gesamtzellextrakte die Expression des E1A<sub>13S</sub>-Proteins und des r-SREC-Fusionsproteins in den transfizierten Zellen (siehe **Abb. 14 B**).

Es stellte sich die Frage, ob r-SREC ebenfalls mit E1A-Proteinen in transformierten Zelllinien interagiert. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden Ad12 E1-transformierte Zelllinien (HEK12-Zellen) bzw. Ad5 E1-transformierte Zelllinien (293-Zellen) mit einem Expressionsvektor für das myc/his-r-SREC-Fusionsprotein transient transfiziert. Das r-SREC-Protein wurde aus den Gesamtzellextrakten mit einem gegen das myc-Epitop des Fusionsproteins gerichteten Antikörper präzipitiert und die gebildeten Immunkomplexe wurden im Western Blot mit einem spezifischen anti-Ad12 E1A- bzw. einem anti-M73-Antiserum analysiert (siehe **Abb. 15 A** und **B**). Auch in diesen Experimenten konnten die adenoviralen Proteine mit dem gegen das myc-Epitop des r-SREC-Fusionsproteins gerichteten Antikörper effizient kopräzipitiert werden, wodurch die *in vivo* Interaktion zwischen E1A-Proteinen und r-SREC sowohl in Ad12 E1- (siehe **Abb. 15 A**, Spur 2) als auch in Ad5 E1- (siehe **Abb. 15 B**, Spur 3) transformierten Zelllinien bestätigt werden konnte. In Immunkomplexen aus Kontroll-transfizierten Zellen wurden, wie zu erwarten, keine E1A-spezifischen Signale nachgewiesen (siehe **Abb. 15 A**, Spur 1 und **Abb. 15 B**, Spur 2).





**Abb. 15 Das r-SREC-Protein interagiert mit E1A-Proteinen in E1-transformierten Zelllinien. (A)** HEK12-Zellen (Ad12 E1-transformiert) bzw. **(B)** 293-Zellen (Ad5 E1-transformiert) wurden mit dem Expressionsvektor für ein myc-Epitop gekoppeltes r-SREC-Protein transient transfiziert. Die Zellen wurden nach 48 h lysiert und r-SREC aus den Gesamtzellextrakten mit einem gegen das myc-Epitop des Fusionsproteins gerichteten Antikörper präzipitiert. Gebildete Immunkomplexe wurden auf Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot Analysen mit spezifischen E1A-Antisera wie angegebenen analysiert.

Zusammenfassend zeigen diese Daten eindeutig, dass das r-SREC-Protein sowohl in transfizierten COS7-Zellen als auch in E1-transformierten Zelllinien effizient an E1A-Proteine bindet.

## 4.6 Identifikation der für die Interaktion mit r-SREC verantwortlichen E1A-Proteindomänen

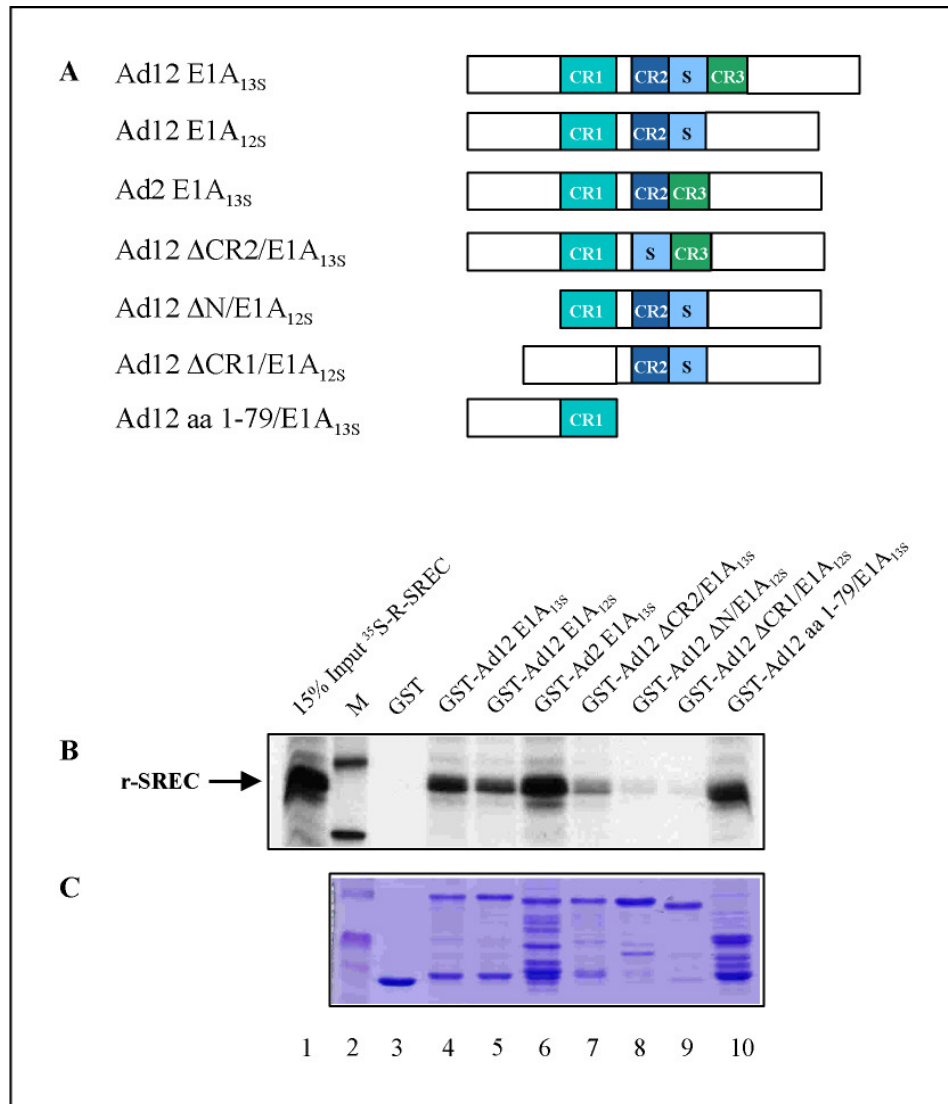
Zur Identifikation der E1A-Domänen, die mit dem r-SREC-Protein interagieren, wurden Protein-Protein-Interaktionsanalysen mit GST-E1Awt-Fusionsproteinen bzw. GST-E1A-Fusionsproteinmutanten (siehe **Abb. 16 A**) und [<sup>35</sup>S]-markiertem, *in vitro* transkribiertem/translatierten r-SREC durchgeführt.

Wie aus **Abb. 16 B** ersichtlich, sind sowohl das Ad12 E1A<sub>13S</sub>-Protein (Spur 4) und das Ad12 E1A<sub>12S</sub>-Protein (Spur 5), als auch das Ad2 E1A<sub>13S</sub>-Protein (Spur 6) in der Lage, das r-SREC-Protein effizient zu binden. Die Deletion der konservierten Region 2 hingegen verringerte deutlich das Bindungspotential des GST-E1A<sub>13S</sub>-Fusionsproteins (GST-Ad12-ΔCR2/E1A<sub>13S</sub>; **Abb. 16 B**, Spur 7) an r-SREC.

Weitere *in vitro* Interaktionsanalysen mit GST-E1A-Fusionsproteinmutanten zeigten, dass die Deletion der N-terminalen Domäne (GST-Ad12-ΔN/E1A<sub>12S</sub>; **Abb. 16 B**, Spur 8) oder der konservierten Region 1 des GST-E1A<sub>12S</sub>-Proteins (GST-Ad12-ΔCR1/E1A<sub>12S</sub>; **Abb. 16 B**, Spur 9) zum Verlust der Interaktion mit r-SREC führte, wohingegen die Aminosäuren 1-79 des E1A<sub>13S</sub>-Proteins (GST-Ad12-aa 1-79/E1A<sub>13S</sub>; **Abb. 16 B**, Spur 10) weiterhin in der Lage sind, r-SREC effizient zu binden.

Diese Experimente zeigen, dass die konservierte Region 2 der adenoviralen E1A-Region die Interaktionsdomäne darstellt, die im Hefesystem (eingesetztes Köderprotein: CR2-S-CR3) zu der Identifikation des r-SREC-Proteins geführt hat. Weiterhin deuten die Ergebnisse darauf hin, dass zusätzlich zur konservierten Region 2, der N-Terminus in Kooperation mit der konservierten Region 1 als E1A-Interaktionsdomäne für das r-SREC-Protein fungiert.

Das Kontrollexperiment bestätigte, dass vergleichbare Mengen an GST-Fusionsproteinen in den *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien eingesetzt wurden (**Abb. 16 C**).



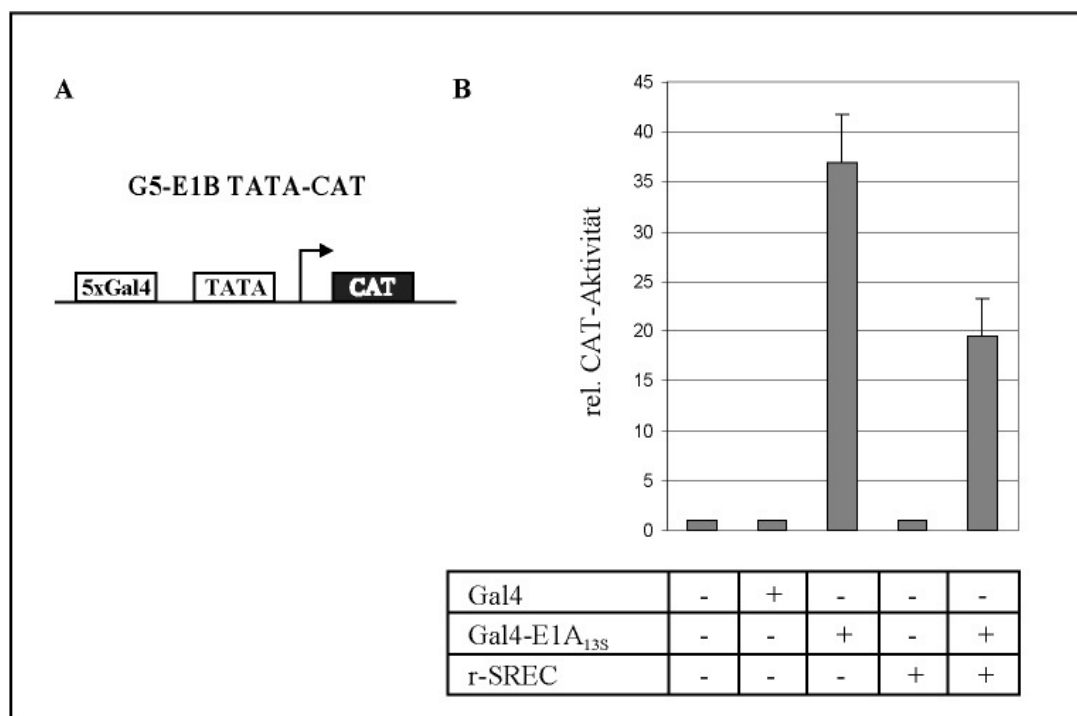
**Abb. 16 Die CR2 sowie der N-terminale Bereich (Aminosäuren 1-79) der E1A-Proteine sind für die *in vitro* Interaktion mit r-SREC verantwortlich.** (A) Für die GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen wurden GST-E1Awt-Fusionsproteine bzw. GST-E1A-Fusionsproteinmutanten wie angegeben eingesetzt. (B) Die GST-Proteindomäne (Spur 3) oder die GST-E1A-Fusionsproteine (Spuren 4 bis 10) wurden mit dem [ $^{35}$ S]-markierten, *in vitro* transkribierten/translatierten r-SREC-Protein wie angegeben inkubiert. Interagierende Proteine wurden eluiert, auf 12%-SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Fluorographie detektiert. Spur 1 repräsentiert 15% des in den Experimenten eingesetzten [ $^{35}$ S]-r-SREC. M: Größenstandard (Spur 2) (C) Gleiche Proteinkonzentrationen der eingesetzten GST-E1A-Fusionsproteine wurden auf 12%-SDS-Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung detektiert.

#### 4.7 R-SREC reprimiert die E1A-vermittelte Aktivierung der Promotoren E2<sub>Ad12</sub>(140 bp) und G5-E1B TATA in transienten Expressionsstudien

In den vorausgegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass r-SREC mit E1A-Proteinen *in vivo* interagiert. Da E1A-Proteine als Transkriptionsfaktoren fungieren, sollte in

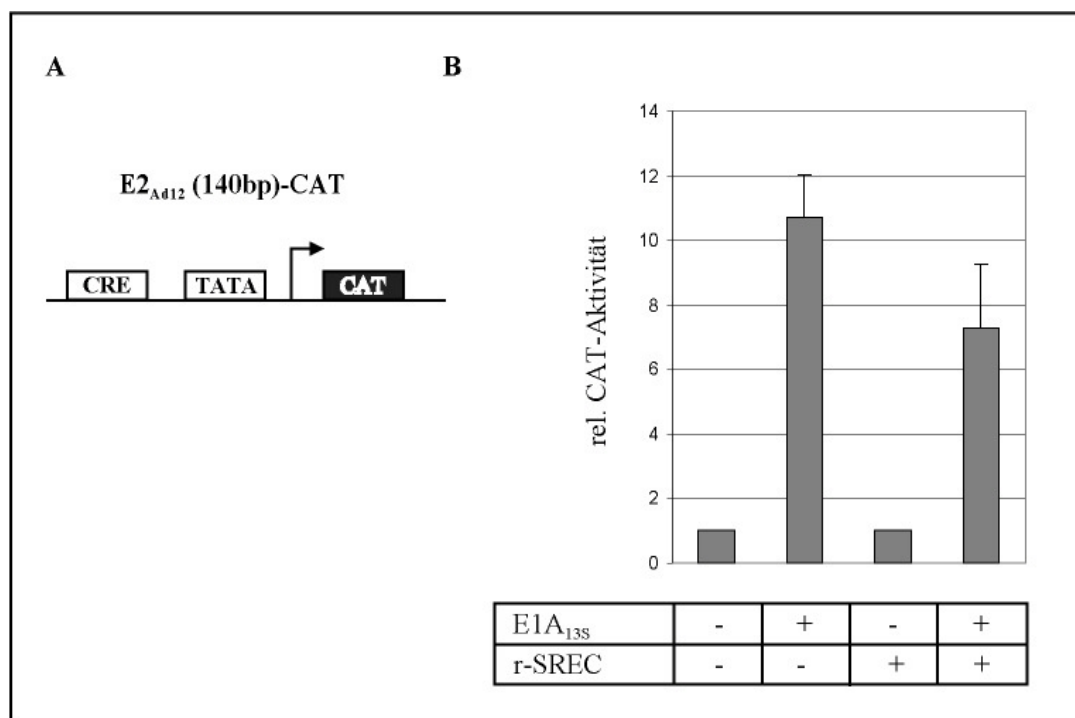
transienten Expressionsstudien untersucht werden, ob r-SREC einen Einfluss im E1A-vermittelten Aktivierungsprozess ausübt.

Das Reporterkonstrukt G5-E1B TATA-CAT (enthält fünf Gal4-Bindestellen sowie die Ad2 E1B-TATA-Box, siehe **Abb. 17 A**) wurde mit einem pRc/RSV-Gal4-E1A<sub>13S</sub>- und/oder einem r-SREC-Expressionsvektor in HeLa-Zellen transient transfiziert. Der Expressionsvektor pRc/RSV-Gal4-E1A<sub>13S</sub> kodiert für ein Fusionsprotein bestehend aus der Gal4-DNA-Bindedomäne und dem E1A<sub>13S</sub>-Protein, von dem in unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde, dass es ein starker Aktivator der CAT-Genexpression des Reporterkonstruktes G5-E1B TATA-CAT ist (Lipinski *et al.*, 1997). Wie erwartet führte die Expression des Gal4-E1A<sub>13S</sub>-Proteins zu einer starken Aktivierung des Promotorkonstruktes (siehe **Abb. 17 B**). Die Koexpression von r-SREC hingegen reprimierte die E1A<sub>13S</sub>-induzierte CAT-Genexpression des Reporterkonstruktes G5-E1B TATA-CAT.



**Abb. 17 R-SREC reprimiert die E1A<sub>13S</sub>-vermittelte Aktivierung des G5-E1B TATA-Promotors.** (A) Schematische Darstellung des eingesetzten Reporterkonstruktes G5-E1B TATA-CAT. Das Reporterkonstrukt enthält fünf Bindestellen für den Hefetranskriptionsfaktor Gal4 sowie die Ad2 E1B-TATA-Box. (B) HeLa-Zellen wurden mit 0,2 µg des Reporterkonstruktes sowie je 1 µg Expressionsvektor für Gal4-E1A<sub>13S</sub> und/oder r-SREC wie angegeben transfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit dem Leervektor konstant gehalten. Die CAT-Enzymaktivität wurde 42 h nach Transfektionsende bestimmt. Die Promotoraktivität des Reporterkonstruktes G5-E1B TATA-CAT in Anwesenheit des Leervektors wurde als 1 nominiert. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus mehreren unabhängigen Transfektionsexperimenten.

Weiterhin wurde das Reporterkonstrukt E2<sub>Ad12</sub>(140bp)-CAT in transienten Expressionsstudien eingesetzt, das die Genexpression durch einen 140 bp umfassenden Bereich der E2<sub>Ad12</sub>-Promotorregion reguliert (siehe **Abb. 18 A**). Dieser Bereich enthält als Promotorelemente ein cAMP-Response-Element (CRE), eine E2F-Bindestelle und eine TATA-Box. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass das cAMP-Response-Element und die TATA-Box die entscheidenden Promotorelemente für die Aktivierung des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors darstellen (Fax *et al.*, 2000). Das Reporterkonstrukt E2<sub>Ad12</sub>(140bp)-CAT wurde mit Expressionsvektoren für Ad12 E1A<sub>13S</sub> und/oder r-SREC in KB-Zellen transient transfiziert. Während die Expression des Ad12 E1A<sub>13S</sub>-Proteins zu einer Aktivierung der CAT-Genexpression des Reporterkonstruktes E2<sub>Ad12</sub>(140bp)-CAT führte, wurde die E1A<sub>13S</sub>-vermittelte Aktivierung des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors durch Koexpression von r-SREC reprimiert (siehe **Abb. 18 B**).



**Abb. 18 R-SREC reprimiert die E1A-vermittelte Aktivierung des E2<sub>Ad12</sub>(140bp)-Promotors.** (A) Schematische Darstellung des eingesetzten Reporterkonstruktes E2<sub>Ad12</sub>(140bp)-CAT. Die CAT-Genexpression im Reporterkonstrukt wird durch ein 140 bp-Fragment des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors reguliert. Das CRE-Element und die TATA-Box sind dargestellt. (B) KB-Zellen wurden mit 1 µg des Reporterkonstruktes sowie je 1 µg Expressionvektor für E1A<sub>13S</sub> und/oder r-SREC wie angegeben transfiziert. Die Menge an transfizierter DNA wurde durch Auffüllen mit dem Leervektor konstant gehalten. Die CAT-Enzymaktivität wurde 42 h nach Transfektionsende bestimmt. Die Promotoraktivität des Reporterkonstruktes E2<sub>Ad12</sub>(140bp)-CAT in Anwesenheit des Leervektors wurde als 1 nominiert. Die relativen Aktivitäten entsprechen dem Mittelwert aus mehreren unabhängigen Transfektionsexperimenten.

#### 4.8 Das r-SREC-Protein ist in der Zelle cytoplasmatisch lokalisiert

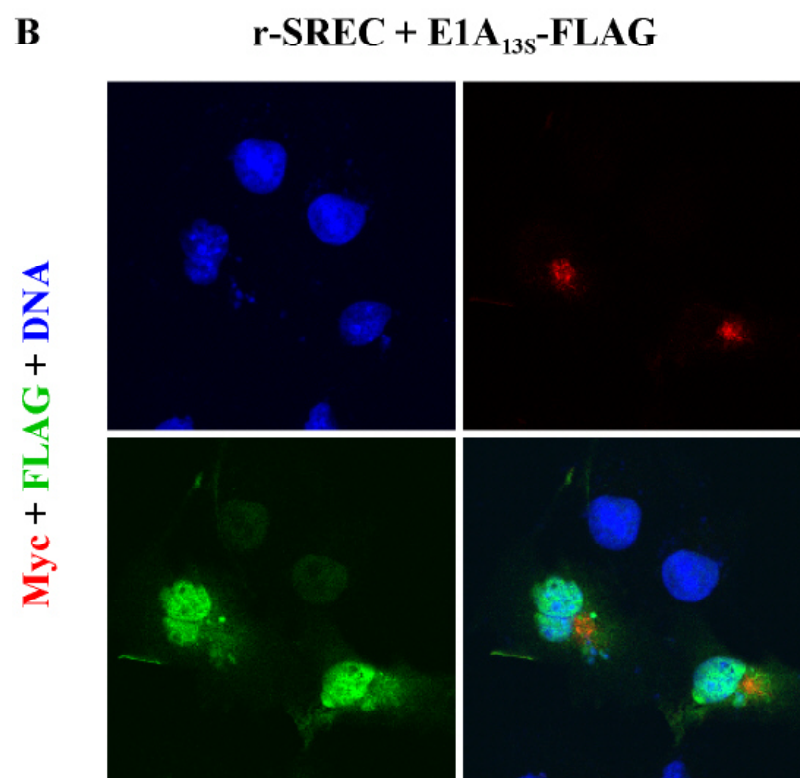
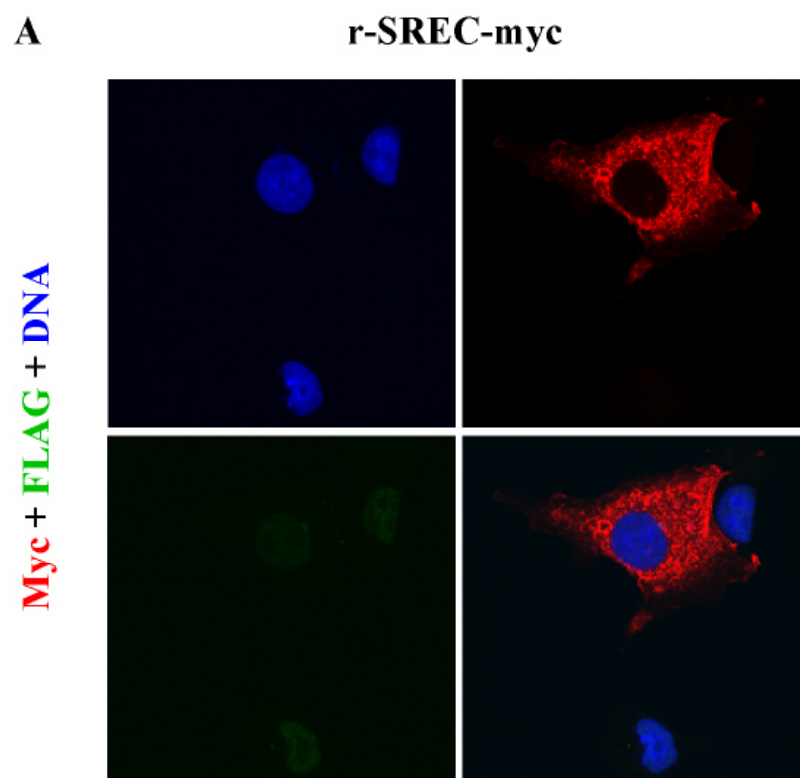
Die Bestimmung der zellulären Lokalisation kann meist Rückschlüsse auf die Funktion eines Proteins zulassen. Um die zelluläre Lokalisation des r-SREC-Proteins zu untersuchen und zu analysieren, ob die Interaktion mit E1A möglicherweise einen Einfluss auf diese Lokalisation ausübt, wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen durchgeführt.

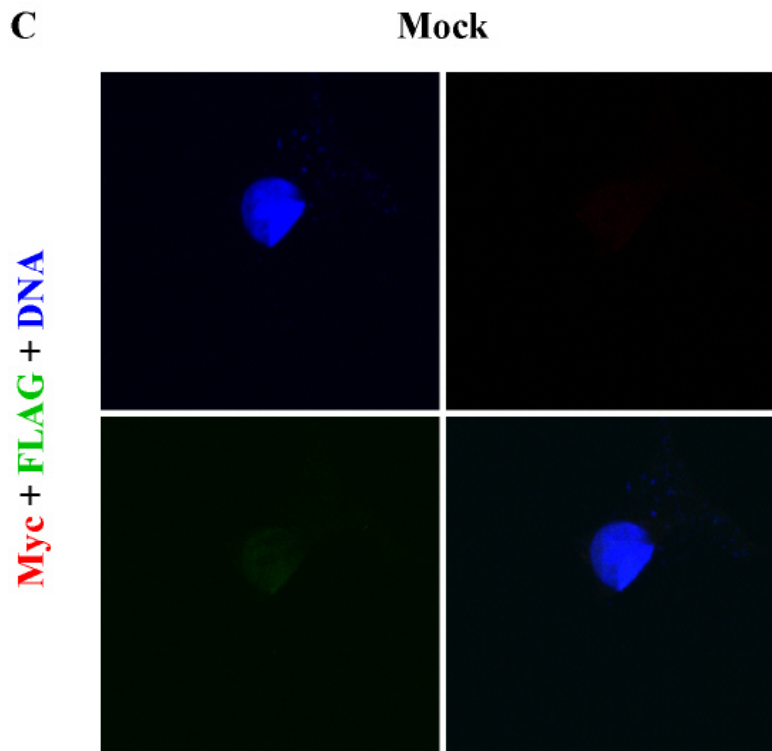
Hierfür wurden COS7-Zellen mit Expressionsvektoren für ein myc/his-r-SREC-Fusionsprotein (exprimiert r-SREC als Fusionsprotein mit einem C-terminalen myc- und his-Epitop) und/oder für ein Ad12 E1A<sub>13S</sub>-FLAG-Fusionsprotein (exprimiert Ad12 E1A<sub>13S</sub> als Fusionsprotein mit einem C-terminalen FLAG-Epitop) transient transfiziert. Nach der Fixierung der Zellen wurde die zelluläre Lokalisation des r-SREC- und des E1A-Proteins durch Immunfluoreszenz-Analysen mit spezifischen, gegen das myc- und/oder das FLAG-Epitop der Fusionsproteine gerichteten Antikörpern untersucht. Diese Experimente zeigten, dass das r-SREC-Fusionsprotein in Abwesenheit des E1A-Proteins cytoplasmatisch lokalisiert ist (siehe **Abb. 19 A**).

Die Expression des E1A<sub>13S</sub>-Proteins wurde hauptsächlich im Zellkern detektiert, jedoch zeigen die Experimente deutlich, dass das adenovirale Protein auch in geringen Mengen im Cytoplasma nachweisbar ist (siehe **Abb. 19 B**). Von Madison und Mitarbeitern wurde gezeigt, dass ein Teil der im Cytoplasma synthetisierten E1A-Proteine im Cytoplasma verbleiben (Madison *et al.*, 2002).

Wie in **Abb. 19 B** gezeigt führte die Koexpression von r-SREC und dem E1A<sub>13S</sub>-Protein zu einer deutlichen Umverteilung des r-SREC-Proteins innerhalb des Cytoplasmas. Das r-SREC-Protein konnte in Anwesenheit des E1A-Proteins punktuell konzentriert am Zellkern nachgewiesen werden. In diesem Bereich wurde ebenfalls das cytoplasmatisch lokalisierte E1A-Protein detektiert.

Erste, weiterführende Immunfluoreszenz-Analysen mit einem ER (endoplasmatischen Reticulum)-spezifischen Marker (Concanavalin A) zeigten darüber hinaus, dass die Lokalisation des r-SREC-Proteins in Abwesenheit des E1A-Proteins mit der Lokalisation des endoplasmatischen Reticulums weitgehend übereinstimmt (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse werden zudem durch Computeranalysen, mit denen die Aminosäuresequenz des r-SREC Proteins analysiert wurde, gestützt, die Hinweise darauf geben, dass r-SREC mit einer Wahrscheinlichkeit von 43% im ER lokalisiert ist.

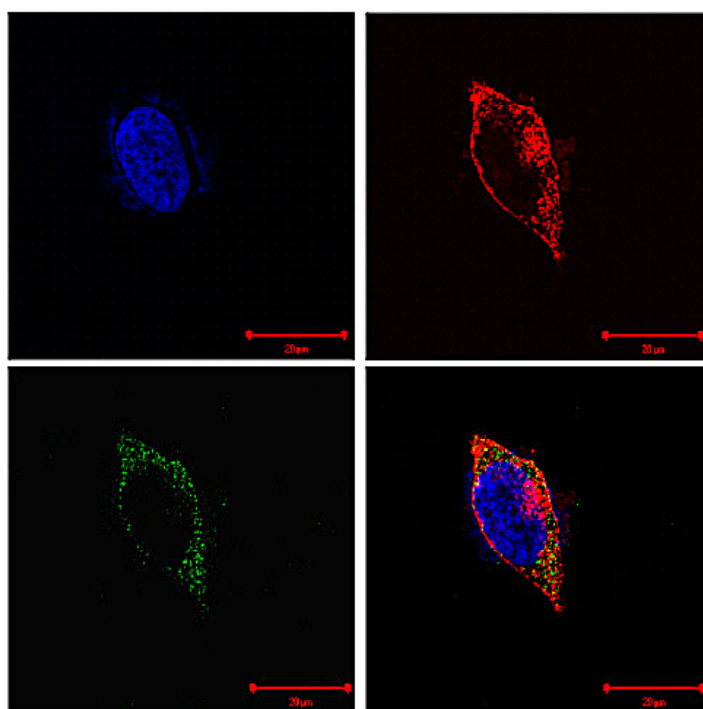
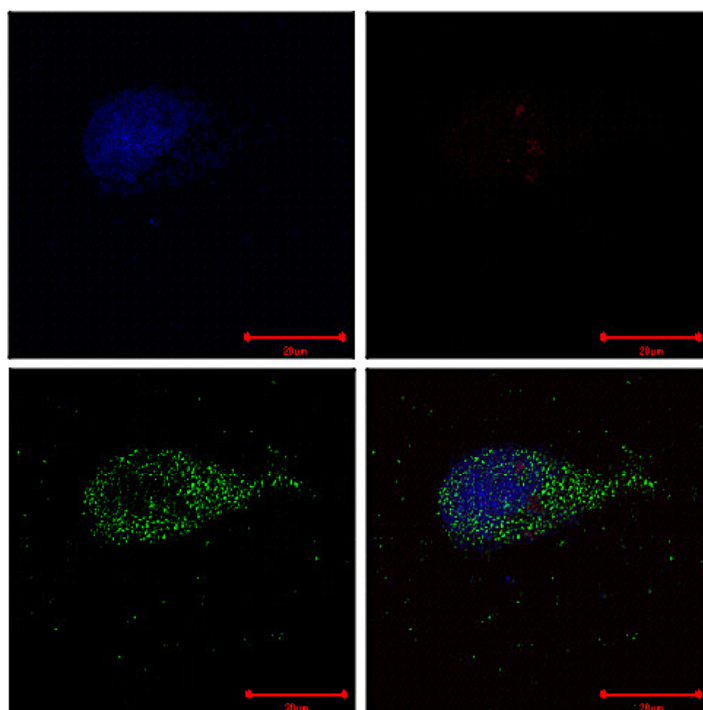


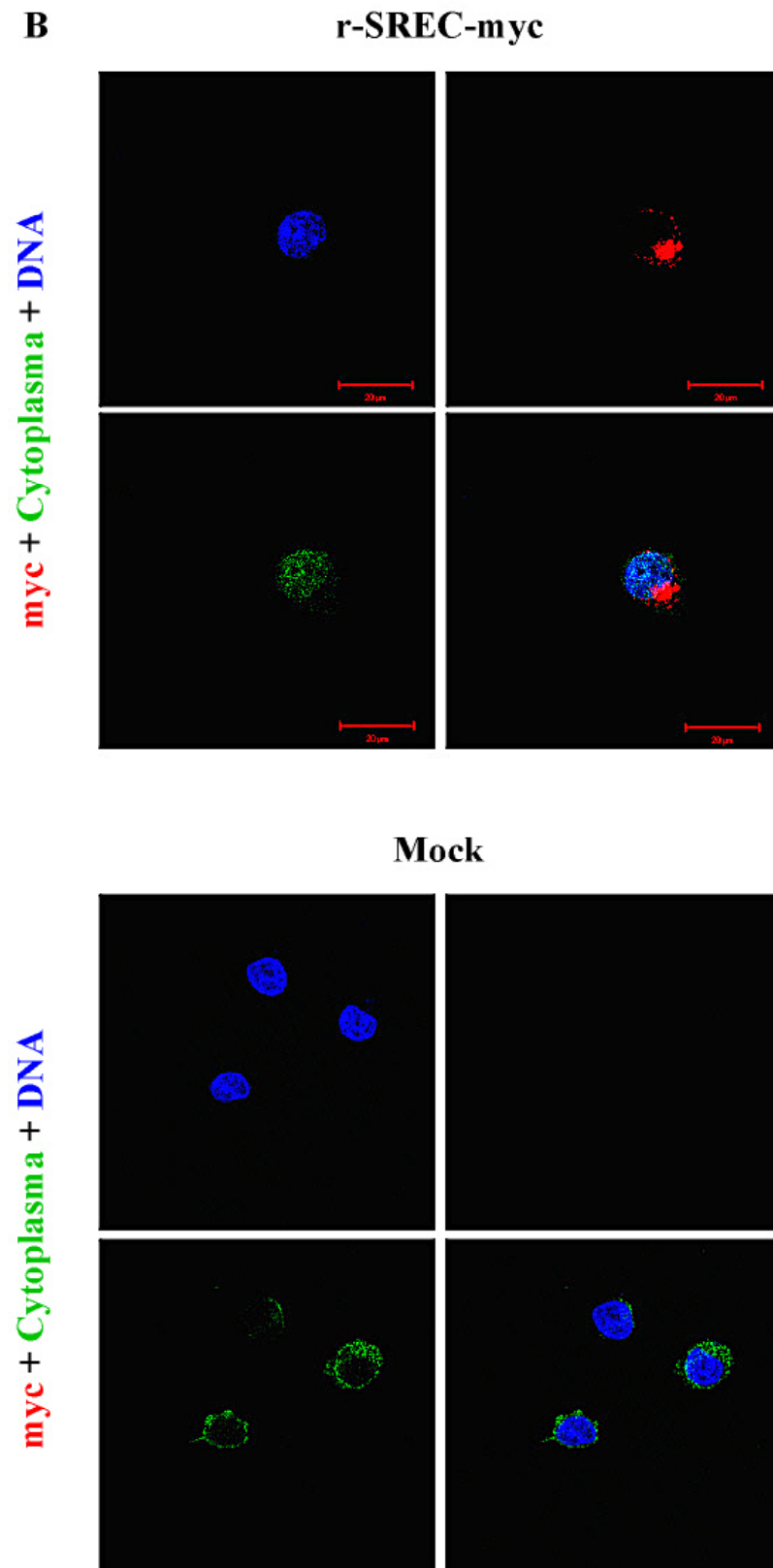


**Abb. 19 Umverteilung des cytoplasmatisch-lokalisierten r-SREC-Proteins durch Koexpression des Ad12 E1A<sub>13S</sub>-Proteins in transient transfizierten COS7-Zellen.** (A) COS7-Zellen wurden mit einem Kontrollvektor für das FLAG-Epitop und einem Expressionvektor für das myc/his-r-SREC-Fusionsprotein transfiziert. Die Zellen wurden 48 h später fixiert. Die intrazelluläre Verteilung des r-SREC-Proteins (rot) wurde mittels Immunfluoreszenz analysiert. (B) COS7-Zellen wurden mit Expressionvektoren für das Ad12 E1A<sub>13S</sub>-FLAG-Fusionsprotein und für das myc/his-r-SREC-Fusionsprotein kotransfiziert. Nach Fixierung der Zellen wurde die intrazelluläre Verteilung des E1A<sub>13S</sub>-Proteins (grün) und des r-SREC-Proteins (rot) mittels Immunfluoreszenz-Untersuchungen bestimmt. (C) COS7-Zellen wurden in Kontrollexperimenten mit Leervektoren für das FLAG-Epitop und das myc/his-Epitop transfiziert. Die Anfärbung der DNA (blau) erfolgte in allen Experimenten mittels Hoechst 33342.

Um eine zelluläre Lokalisation des r-SREC-Proteins in transformierten Zelllinien zu untersuchen, wurden Ad12 E1-transformierte (HEK12) und Ad5 E1-transformierte (293) Zellen mit dem Expressionsvektor für das myc/his-r-SREC-Fusionsprotein transient transfiziert. Die Fixierung der Zellen erfolgte 48 h nach Transfektionsbeginn. Die Lokalisation des r-SREC-Fusionsproteins wurde in Immunfluoreszenz-Analysen mit einem spezifischen gegen das myc-Epitop des Fusionsproteins gerichteten Antikörper detektiert (siehe **Abb. 20 A und B**). Zur genauen Bestimmung des Cytoplasmas wurde zusätzlich ein anti-Actin-Antikörper eingesetzt. Diese Untersuchungen zeigten, dass r-SREC in E1-transformierten Zelllinien hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert ist. Jedoch ist auch hier, wie in den zuvor mit Ad12 E1A<sub>13S</sub> und r-SREC kotransfizierten COS7-Zellen, eine erhöhte Konzentration des r-SREC-Proteins an der Kernmembran zu beobachten.



**A****r-SREC-myc****myc + Cytoplasma + DNA****Mock****myc + Cytoplasma + DNA**

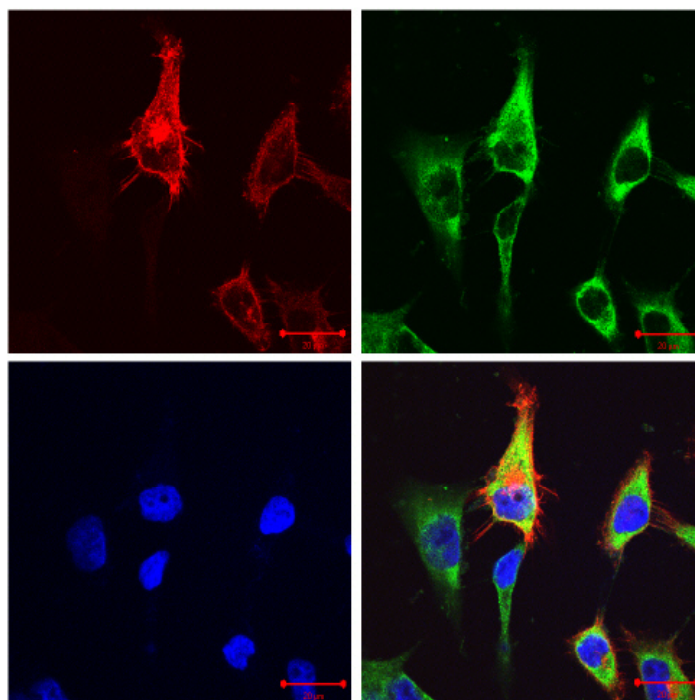
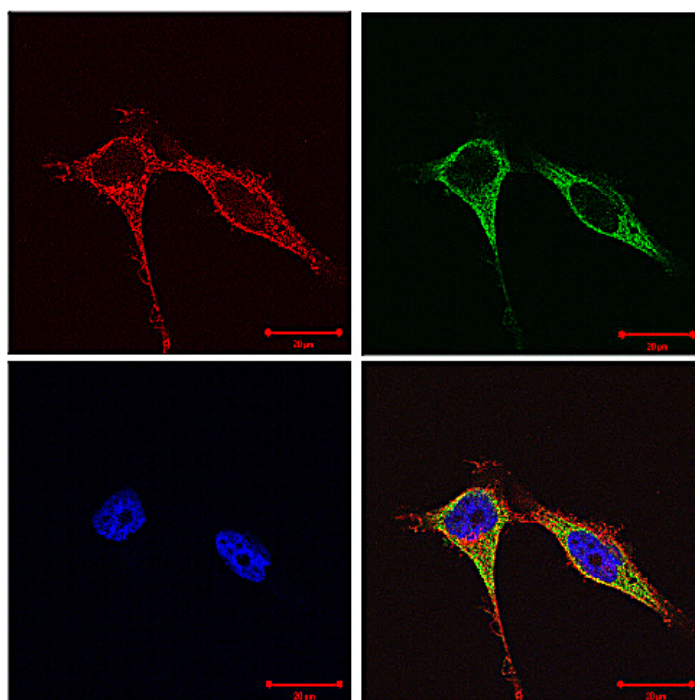


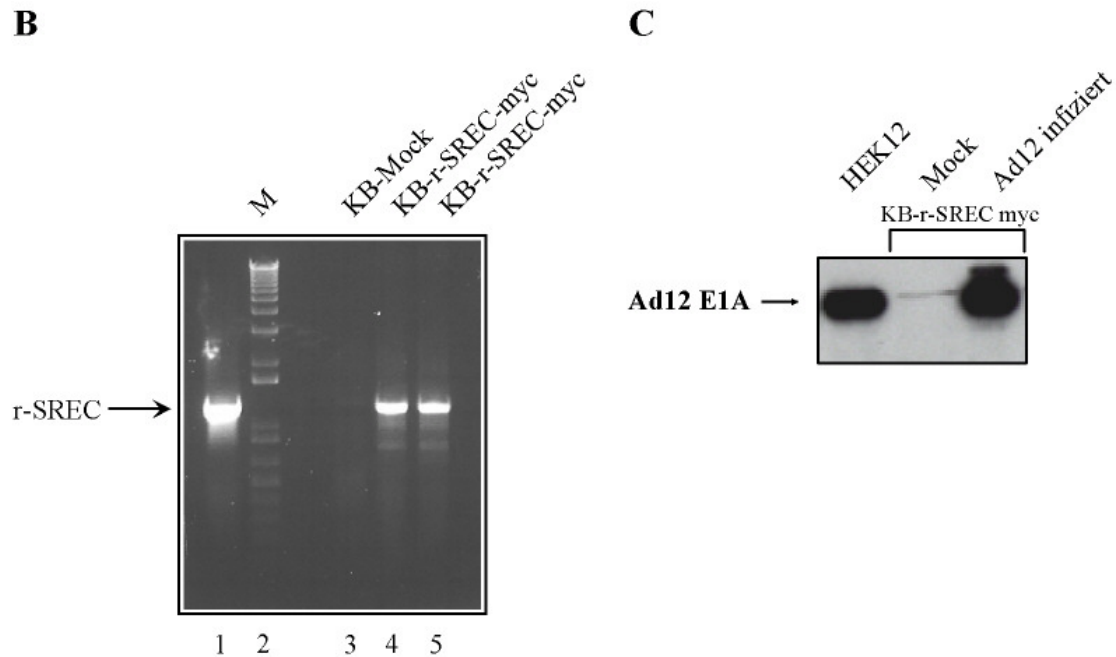
**Abb. 19 Intrazelluläre Verteilung des r-SREC-Proteins in E1-transformierten Zelllinien.** (A) Ad12 E1-transformierte HEK12-Zellen oder (B) Ad5 E1-transformierte 293-Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für das myc/his-r-SREC-Fusionsprotein transient transfiziert. Die Zellen wurden nach 48 h fixiert und die zelluläre Lokalisation von r-SREC (rot) in Immunfluoreszenzanalysen untersucht. Zur Detektion des Cytoplasmas wurde zusätzlich ein anti-Actin-Antikörper (grün) eingesetzt. Die Zellen wurden in Kontrollexperimenten mit einem Leervektor für das myc/his-Epitop transfiziert (Mock). Die Anfärbung der DNA (blau) erfolgte in allen Experimenten mittels Hoechst 33342.

Zusätzlich habe ich die zelluläre Lokalisation des r-SREC-Proteins in Adenovirus-infizierten Zelllinien untersucht. Hierfür wurden zunächst KB-Zelllinien etabliert, in denen der myc/his-r-SREC exprimierende Vektor stabil in das Zellgenom integriert und das r-SREC-Protein konstitutiv exprimiert wird. Diese Zelllinien wurden durch Western Blot Analysen auf die Expression des r-SREC-Proteins hin untersucht. Durch PCR-Analysen zellulärer genomischer DNA mit r-SREC-spezifischen Primern wurde die Integration des r-SREC-Expressionsvektor in das zelluläre Genom nachgewiesen (siehe **Abb. 21 B**).

Die r-SREC-Zelllinie wurden mit Ad 12 infiziert und die Zellen 20 h nach Infektionsbeginn fixiert. In Immunfluoreszenz-Analysen mit einem gegen das myc-Epitop des r-SREC-Fusionsproteins gerichteten Antikörper wurde die zelluläre Lokalisation des r-SREC-Proteins untersucht (siehe **Abb. 21 A**). Hier bestätigte sich, dass das r-SREC-Protein in Adenovirus-infizierten Zellen cytoplasmatisch lokalisiert ist. Eine erhöhte Konzentration des Proteins im Bereich der Kernmembran konnte wie in den vorausgegangenen Experimenten detektiert werden.

In Kontrollexperimenten konnte die effiziente Expression des Ad12 E1A-Proteins in den infizierten Zellen bestätigt werden (siehe **Abb. 21 C**).

**A****Ad12 infiziert****r-SREC-myc + Cytoplasma + DNA****Mock****r-SREC-myc + Cytoplasma + DNA**



**Abb. 21 Zelluläre Lokalisation des r-SREC-Proteins in Ad12-infizierten r-SREC-Zelllinien.** (A) Stabil transformierte r-SREC-myc-Zelllinien wurden mit Ad 12 infiziert und die Zellen 20 h nach Infektionsbeginn fixiert. Die Immunfluoreszenz-Analysen wurden mit einem gegen das myc-Epitop des r-SREC-Fusionsproteins gerichteten Antikörper durchgeführt (rot). Zur Detektion des Cytoplasmas wurde zusätzlich ein anti-Actin-Antikörper (grün) eingesetzt. Die Zellen wurden in Kontrollexperimenten mit einem Leervektor für das myc/his-Epitop transfiziert (Mock). Die Anfärbung der DNA (blau) erfolgte in beiden Experimenten mittels Hoechst 33342. (B) Untersuchung der transformierten KB-Zelllinien auf die Integration des r-SREC-myc-Expressionsvektors in das zelluläre Genom mit r-SREC-spezifischen Primern. (C) Western Blot Experimente bestätigten die effiziente Expression des Ad12 E1A-Proteins in den infizierten Zellen. Zur Kontrolle wurde Gesamtzellextrakt aus Ad12 E1-transformierten Zellen (HEK12) in Western Blot Analysen eingesetzt.

Wie meine Ergebnisse zeigen wird der Ad12 E1A<sub>135</sub>-vermittelte Transaktivierungsprozess durch die Expression von r-SREC in transienten Expressionsstudien reprimiert. Die Immunfluoreszenzanalysen zeigen jedoch, dass R-SREC ein cytoplasmatisch lokalisierter Faktor ist. Diese Ergebnisse implizieren, dass r-SREC seine reprimierende Funktion nicht im Zellkern ausübt.

## 5. Diskussion

Das Adenovirus-Wirtszell-System stellt ein ideales Modellsystem dar um zelluläre Prozesse wie die Zellzykluskontrolle, Differenzierung, Apoptose sowie die onkogene Transformation zu untersuchen, da die Funktionen der adenoviralen E1A-Proteine in vielfältiger Weise in diese Mechanismen eingreifen. So haben Analysen der Funktionen der Ad E1A-Region zur Identifikation zellulärer Faktoren geführt, die in diese Prozesse involviert sind, wie z.B. dem Retinoblastom-Protein pRB (Whyte *et al.*, 1988) und Koaktivatoren wie p300 (Eckner *et al.*, 1994). Zudem haben diese Studien erheblich zum Verständnis der molekularen Mechanismen der Genregulation beigetragen.

Alle bis heute bekannten Funktionen der E1A-Proteine werden durch Protein-Protein-Interaktionen mit zellulären Faktoren vermittelt. Die Isolierung und Charakterisierung unbekannter zellulärer Faktoren, die mit spezifischen, funktionellen Domänen (CR1-S-CR3) der E1A-Proteinen interagieren, sollte daher zur weiteren Aufklärung E1A-vermittelter Funktionen dienen.

Im Zuge dieser Arbeit wurde von mir mit Hilfe eines modifizierten Hefe „Two-Hybrid“-Systems ein bisher nicht beschriebener, E1A-Protein bindender zellulärer Faktor (r-SREC) identifiziert. In meinen Experimenten konnte ich im Wesentlichen zeigen,

1. dass r-SREC mit E1A-Proteinen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* interagiert. Für die physikalische Interaktion sind die CR2 sowie der N-terminale Bereich (N-Terminus in Kooperation mit CR1) der E1A-Proteine von entscheidender Bedeutung,
2. dass r-SREC in transienten Expressionsstudien die Ad12 E1A<sub>13S</sub>-vermittelte Transaktivierung spezifischer viraler Promotoren reprimiert,
3. dass r-SREC in der Zelle cytoplasmatisch lokalisiert ist.

### 5.1 R-SREC interagiert mit E1A-Proteinen *in vivo* und *in vitro*

Zur Identifikation Ad12 E1A-CR2-S-CR3 bindender Faktoren wurde in der vorliegenden Arbeit das Hefe „SOS-Two-Hybrid“-System eingesetzt. Dieses Hefesystem erlaubt es, im Gegensatz zum klassischen Hefe „Gal4-Two-Hybrid“-System, Interaktionsanalysen mit transaktivierenden Proteindomänen als Köder durchzuführen. Das „SOS-Two-Hybrid“-

System wurde von Aronheim und Mitarbeitern entwickelt und zur Identifikation von Proteinen eingesetzt, die mit der Jun-Untereinheit des Transkriptionsfaktors AP-1 interagieren (Aronheim *et al.*, 1997). In unserer Arbeitsgruppe wurde dieses System bereits erfolgreich zum Nachweis einer Interaktion des N-Terminus (AS 1-29) der Ad12 E1A-Region mit der C/H3-Domäne (Cystein/Histidin-reiche Domäne 3) des zellulären Koaktivators p300 (Lipinski *et al.*, 1999) sowie für Interaktionsanalysen des E1A<sub>12S</sub>-Proteins mit den RI $\alpha$ -und RII $\alpha$ -Untereinheiten des PKA-Holoenzym (Fax *et al.*, 2001) eingesetzt.

Da gezeigt wurde, dass das konventionelle Hefe „SOS-Two-Hybrid“-System bei der Durchmusterung von Säugetier-Expressionsbanken häufig zur Isolierung falsch-positiver cDNAs führt, die für Proteine der Ras GTPase-Familie kodieren, wurde ein modifiziertes Hefesystem eingeführt (Aronheim, 1997). Das Prinzip dieses Systems besteht darin, dass sich die Expression von mGAP in Hefezellen inhibierend auf die Aktivität von mRas auswirkt, wodurch die Anzahl der isolierten Ras-Protein-exprimierenden, falsch-positiven Klone reduziert wird.

Die Protein-Protein-Interaktionsstudien mit Hilfe dieses modifizierten Hefesystems führten im Laufe meiner Arbeit zu einer Identifikation von 19 potentiell-positiven Hefeklonen, bei denen nach ersten Analysen eine Interaktion des Köderproteins mit einem Protein der cDNA-Expressionsbank stattgefunden haben könnte. In den abschließenden Interaktionsanalysen zeigten zehn dieser Hefeklonen jedoch keine Abhängigkeit des Wachstums von der Expression des Köderproteins (CR2-S-CR3). Bei diesen selektierten falsch-positiven Klonen wurden somit entweder, (1) trotz Verwendung des modifizierten Systems, Proteine der Ras GTPase-Familie exprimiert, wodurch der Ras-abhängige Signalkontrollweg „kurzgeschlossen“ wurde, oder (2) Proteine exprimiert, die nicht mit dem Köder, sondern mit dem SOS-Anteil des Köder-Fusionsproteins interagierten. Durch Sequenzanalysen von sechs dieser zehn isolierten cDNAs und anschließenden Vergleichen der Nukleotidsequenzen über eine Computer-Datenbank konnte ich zeigen, dass diese selektierten cDNAs für drei unterschiedliche Ras-Proteine kodieren. Man kann hier davon ausgehen, dass die vier nicht sequenzierten cDNAs ebenfalls für Proteine der Ras GTPase Familie kodieren. Auszuschließen ist jedoch nicht, dass durch Sequenzanalysen cDNAs identifiziert werden, die für ein Produkt kodieren, das mit dem SOS-Anteil des Köderproteins interagiert.

Bei einer Gesamtzahl von  $1,75 \times 10^7$  durchmusterten Hefeklonen wurden von mir sechs von insgesamt zehn potentiellen cDNAs identifiziert, die für Proteine der Ras GTPase-Familie kodieren. Vor Beginn meiner Untersuchungen wurde in unserer Arbeitsgruppe

zunächst das konventionelle Hefe „SOS-Two-Hybrid“-System, in dem das mGAP-Protein nicht exprimiert wird, für Protein-Protein-Interaktionsstudien eingesetzt. In diesen Analysen, in denen die N-terminale Domäne des Ad12 E1A-Proteins als Köder fungierte, wurden bei einer Gesamtzahl von  $2,35 \times 10^6$  durchmusterten Klonen (dies entspricht nur etwa 13,5% der durchmusterten Hefeklone, die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen) 16 mRas-exprimierende Hefeklone aus derselben Rattenhypophysen-cDNA-Bank selektiert.

Vergleiche dieser, in unserer Arbeitsgruppe erhaltenen Daten bestätigten somit, dass die Selektion mRas-exprimierender falsch-positiver Klone bei der Durchmusterung von Säugetier-cDNA-Expressionsbanken durch den Einsatz des modifizierten Hefesystems und die Expression von mGAP zwar nicht vollständig ausgeschlossen, die Anzahl der selektierten falsch-positiven Klone jedoch deutlich verringert wird.

In den abschließenden Interaktionsanalysen konnte ich einen interaktions-positiven Hefeklon isolieren. Durch Sequenzanalysen und anschließenden Abgleichen mit verschiedenen Datenbanken konnte nachgewiesen werden, dass hier eine cDNA (r-SREC) exprimiert wurde, die für einen bisher nicht beschriebenen, E1A-bindenden zellulären Faktor kodiert.

Warum bei der Durchmusterung der cDNA-Expressionsbank keine bekannten E1A-bindenden, zellulären Faktoren identifiziert werden konnten, wie eigentlich erwartet, könnte wie folgt erklärt werden. (1) Bei der eingesetzten Rattenhypophysen-Bibliothek handelte es sich um eine mit Random-Primern generierte cDNA-Expressionsbank. Da somit im Vergleich zur mRNA meist nur verkürzte DNA-Moleküle generiert werden, ist zunächst fraglich, ob die Interaktionsmotive der entsprechenden Proteine in dieser Bank exprimiert werden. (2) Die Proteinstruktur des Köderproteins (CR2-S-CR3) könnte aufgrund der geringen Größe und der fehlenden restlichen E1A-Aminosäuresequenzen einen Einfluss auf die Proteinfaltung und somit auf die Interaktion dieser E1A-Domänen mit zellulären Proteinen haben. Allerdings ist gezeigt, dass zumindest CR3 allein, d.h. auch ohne weitere adenovirale Aminosäuresequenzen, als funktionelle Domäne mit einigen zellulären Proteinen interagieren kann (Mazzarelli *et al.*, 1997).

Durch Immunpräzipitationen konnte ich die *in vivo* Interaktion des r-SREC-Proteins mit E1A-Proteinen sowohl in transient transfizierten Zelllinien als auch in Ad12 und Ad5 E1-transformierten Zelllinien bestätigen. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Interaktion zwischen E1A-Proteinen und dem zellulären Faktor r-SREC von physiologischer Relevanz ist.



Es stellte sich die Frage, welche Interaktionsdomänen der E1A-Proteine für die Bindung an r-SREC von Bedeutung sind. Die Identifikation dieser Domänen lassen möglicherweise Rückschlüsse zu, in welche durch E1A-Proteine vermittelte Funktionen r-SREC involviert sein könnte. Es wurde u.a. gezeigt, dass die Funktionen des nicht-konservierten Aminoterminus sowie der konservierten Regionen 1 und 2 der E1A-Proteine hauptsächlich für die immortalisierenden und Zellzyklus-regulierenden Funktionen der E1A-Region verantwortlich sind (Whyte *et al.*, 1988).

Durch *in vitro* Interaktionsstudien konnte ich belegen, dass die konservierte Region 2 sowie der N-Terminus in Kooperation mit CR1 der E1A-Proteine als Interaktionsmotive für r-SREC fungieren, wohingegen weder die Spacer-Region noch CR3 für die physikalische Interaktion der E1A-Proteine mit r-SREC von Bedeutung sind. Die Tatsache, dass E1A-Domänen kooperativ in die Bindung zellulärer Faktoren eingreifen, ist gut beschrieben. Es konnte u.a. gezeigt werden, dass die Kooperation des Aminoterminus mit CR1 für die funktionelle Interaktion der Ad2/Ad5 E1A-Proteinen mit p300/CBP essentiell ist. Studien von Wang und Mitarbeitern belegen hier, dass keine der beiden Domänen allein in der Lage ist, physikalisch mit p300 oder CBP zu interagieren (Wang *et al.*, 1993a).

Aufgrund meiner Ergebnisse, die belegen, dass der N-terminale Bereich und die CR2-Domäne mit r-SREC interagieren, könnte man vermuten, dass mit r-SREC ein bisher unbekannter Faktor identifiziert wurde, der möglicherweise für durch adenovirale E1A-Proteine vermittelte Funktionen im Prozess der Immortalisierung und der Regulation des Zellzyklus von Bedeutung ist. Diese Annahme ließe sich durch Daten von Oyama und Mitarbeitern stützen, die gezeigt haben, dass das humane Homolog zu r-SREC in die Tumorsuppression involviert zu sein scheint (Oyama *et al.*, 2000; siehe **Kap. 5.2**)

## **5.2 R-SREC exprimiert ein Protein (366 AS) mit bisher unbekannter Funktion**

Um Informationen über die Größe der nativen mRNA, die Gewebe, in denen sie exprimiert wird und die Stärke der Expression zu erhalten, wurden Northern Blot Analysen mit RNA aus Ratten- und Humangeweben durchgeführt. Durch diese Untersuchungen konnte ich in Rattengewebe eine 1,6 kb mRNA und eine zusätzliche mRNA (3,4 kb) in Herz, Hirn, Lunge Niere und Hoden identifizieren. Dies wirft die Frage auf, ob es sich hier um Spleißvarianten oder um zwei unabhängige Gene einer Genfamilie mit hoch-homologer Nukleotidsequenz

handelt. Es besteht auch die Möglichkeit, dass ein Gen von zwei verschiedenen Promotoren transkribiert wird. Ob es sich hier um zwei Gene handelt, soll in späteren Experimenten mit Hilfe anderer molekularbiologischer Methoden, wie z.B. FISH-Analysen näher untersucht werden.

Weiterführende Northern Blot Analysen zeigten, dass im Vergleich zu den Rattengeweben in humanen Geweben nur eine, zudem größere mRNA (4,4 kb) exprimiert wird. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass in humanen Geweben die nicht kodierenden Bereiche länger sind. Es könnte jedoch auch vermutet werden, dass in menschlichen Zellen aufgrund differentieller Spleißvorgänge weitere, 5'-gelegene kodierende Sequenzen vorhanden sind, die vor dem von mir identifizierten Startkodon der Ratten-r-SREC mRNA liegen.

Da die r-SREC mRNA in verschiedenen Geweben und Spezies exprimiert wird, lässt sich in jedem Fall vermuten, dass das r-SREC-Protein eine wichtige Rolle in der Physiologie der Zelle spielt.

Nach Isolierung der ursprünglichen cDNA mit Hilfe des Hefesystems musste aufgrund der Generierung der Bank (Random-Priming) und der Nukleotid-Sequenzanalysen angenommen werden, dass diese cDNA nicht die vollständige kodierende Sequenz enthielt. Die Identifikation der vollständigen kodierenden Sequenz der identifizierten trunkierten cDNA war von entscheidender Bedeutung, da nur durch die Erfassung der Vollängen cDNA gewährleistet werden kann, dass das r-SREC-Protein effizient exprimiert wird.

Für die Isolierung der aminoterminalen Region der cDNA wurde von mir die Methode der RACE-PCR in unserem Labor etabliert. Da der N-terminale Bereich der cDNA einen hohen GC-Gehalt (81%) aufweist, waren hier zunächst zahlreiche Änderungen der PCR-Bedingungen und -Protokolle erforderlich, um die Vollängen der cDNA erfolgreich zu amplifizieren. Die Analyse der Nukleotidsequenz der so amplifizierten cDNA zeigte, dass die von Kozak (1996) aufgestellten Kriterien für die Festlegung der vollständigen cDNA-Sequenz erfüllt wurden. Es konnte ein im richtigen Kontext stehendes ATG-Kodon (AAGATGG, Kozak-Sequenz) und ein im selben Leseraster dazu in 5'-Richtung gelegenes Stopkodon identifiziert werden. Aufgrund dieser Daten und der Tatsache, dass die Länge der Nukleotidsequenz (1620 bp) mit der Größe der in Rattengeweben exprimierten mRNA (kleines Transkript 1,6 kb) korrespondiert, konnte ich belegen, dass hier die vollständige kodierende cDNA-Sequenz identifiziert wurde.

Vergleiche der Nukleotidsequenz der von mir identifizierten r-SREC-cDNA mit Sequenzen aus verschiedenen Computer-Datenbanken ergaben, dass eine zu 97% homologe Sequenz auf dem humanen Chromosom 8p21.3-p22 lokalisiert ist. Diese Sequenz wurde erstmals von Oyama und Mitarbeitern als REC/REAM-Gen beschrieben (Oyama *et al.*, 2000). Daten dieser Arbeitsgruppe lassen annehmen, dass dieses humane Gen in die Tumorsuppression involviert sein könnte, da gezeigt wurde, dass seine Expression in der Mehrzahl der in dieser Arbeit untersuchten Primärtumore des Dickdarms und in Lebermetastasen signifikant reduziert ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe werden von der Vermutung unterstützt, dass in der Region p21.3-p22 des humanen Chromosoms 8, Gene lokalisiert sind, die mit der Entwicklung und der Progression von Tumoren in verschiedenen Geweben in Verbindung gebracht werden können. Es wurde unter anderem gezeigt, dass in diesem Bereich Deletionen in verschiedenen Genen vorkommen. So wurde in dieser Region des humanen Chromosoms 8 ein Verlust der Heterozygotie (LOH) in verschiedenen Tumoren, wie z.B. Brust-, Dickdarm-, Prostata- und Blasen Tumoren nachgewiesen (Anbazhagan *et al.*, 1998; Bova *et al.*, 1993). LOH ist ein Hinweis auf die Existenz von Tumorsuppressorgenen auf den untersuchten Chromosomen. Der Nachweis von LOH führte zu der Identifizierung verschiedener Tumorsuppressorgene, wie z.B. RB (Friend *et al.*, 1986) und p53 (Baker *et al.*, 1989). Dies legt die Vermutung nahe, dass in dem Bereich des Chromosoms 8p21.3-p22 Tumorsuppressorgene lokalisiert sind. Daten aus verschiedenen Arbeitsgruppen bestätigen diese Annahme. So wurde von Fujiwara und Mitarbeitern eine cDNA aus einer fetalen Lungen-cDNA-Bibliothek isoliert, deren Nukleotidsequenz auf dem Chromosom 8p21.3-p22 lokalisiert ist. Experimente zeigten, dass das Gen als potentiell Tumorsuppressorgen fungiert. Mutationen dieses Gens konnten in Leber-, Dickdarm- und Lungentumoren nachgewiesen werden (Fujiwara *et al.*, 1995).

### **5.3 Mögliche Funktionen der innerhalb des r-SREC-Proteins identifizierten Domänen**

Durch Vergleiche der r-SREC-Proteinsequenz mit Sequenzen aus Computer-Datenbanken habe ich zwei Typen von putativen funktionellen Domänen (DHHC-Domäne und vier putative Transmembran-Regionen) innerhalb des r-SREC-Proteins identifiziert. Die möglichen Funktionen dieser Domäne werden im Folgenden diskutiert.

### (1) *DHHC-Domäne*

Eine erste Beschreibung dieser hoch-konservierten, Cystein-reichen Domäne erfolgte durch Putilina und Mitarbeiter (Putilina *et al.*, 1999). Die Consensus-Sequenz der DHHC-Domäne wurde von dieser Arbeitsgruppe aufgestellt:



Die DHHC-Domäne enthält im N-terminalen Bereich (hier rot dargestellt) vier Cysteine und eine schleifenähnliche Struktur, die der Struktur der Cys4-Zink-Fingern von Steroidrezeptoren ähnelt. Der C-terminale Bereich (hier grün dargestellt) der DHHC-Domäne ist zwar Finger-ähnlich aufgebaut, gleicht allerdings keinen Strukturen bisher bekannten Fingertypen.

Vergleiche der Aminosäuresequenz verschiedener Spezies zeigten, dass die DHHC-Domäne hoch konserviert ist (siehe **Abb. 21**).

<b>Consensus</b>	<b>C C KP RS HCS C +CVh+MDHHCpWhnNCVG +NY+ FLLFL</b>
<u><b>r-SREC</b></u>	<u><b>*DR*RLIKPDRCH**SVCDK*ILKM*****PWVNN*VGF S*YKF*FLLF</b></u>
<b>H. sapiens</b>	<b>*NL*NVDVSARSK**SA*NK*VCGF*****KWLNN*VGER*YRK*LHSV</b>
<b>S. cerivisiae</b>	<b>*PS*RIWRPFRSS**SS*DV*ILKM*****PWVNN*IGKR*YRF*LIFL</b>
<b>S. pombe</b>	<b>*LK*FQVKPPRSY**GA*KR*INRY*****PWTGN*VGAR*HRT*LLEFV</b>
<b>C. elegans</b>	<b>*VP*NGFKVPRSH**SK*DR*CMKM*****PWINN*VGHR*HQY*LREFL</b>
<b>A. thaliana</b>	<b>*TL*NAEVRKFSK**RS*DK*VDCF*****RWLNN*VGRK*YMT*ISLM</b>

**Abb. 21: Vergleich der Aminosäuresequenzen der DHHC-Domäne verschiedener Spezies.** Die Aminosäuresequenz des r-SREC-Proteins ist blau gekennzeichnet. Die Consensus Sequenz (obere Zeile) zeigt konservierte Bereiche (fett gedruckt). In den Aminosäuresequenzen der verglichenen Spezies sind konservierte Bereiche als Stern dargestellt, homologe Bereiche sind in den Aminosäuresequenzen unterstrichen. +/- : Arginin oder Lysin (in der Consensus Sequenz).

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl Cystein-reicher Domänen identifiziert, deren Funktionen zum Teil gut charakterisiert sind. Es gibt unterschiedliche Fingertypen, die in makromolekulare Interaktionen in der Zelle involviert sind. Es wurde z.B. gezeigt, dass die Cis<sub>2</sub>/His<sub>2</sub>-Zink-Finger von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. TFIIIA (transcription factor IIIA) und anderen Proteinen zur DNA-Bindung genutzt werden (Pavletich und Pablo, 1991; Pan

und Coleman, 1991). Der Fingertyp Cys<sub>2</sub>/Cys<sub>2</sub>, der u.a. in der konservierten Region 3 der E1A Proteine vorkommt, ist in Protein-Protein-Interaktionen involviert (Lillie *et al.*, 1986; Liu und Green, 1990).

Trotz der Spekulation, dass die DHHC-Domäne in Protein-Protein-Interaktionen involviert ist, ist ihre genaue Funktion bis heute weitgehend unbekannt. Daten verschiedener Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass einige Proteine, die eine DHHC-Domäne enthalten, in Signaltransduktionswege eingreifen. Bis heute wurden zwei Proteine aus *S. cerevisiae* näher beschrieben, die eine DHHC-Domäne beinhalten. Akr1p interagiert mit dem Pheromonrezeptor-gebundenen G-Protein (Roth *et al.*, 2002), wohingegen die Funktionen des Erf2p-Proteins für die effiziente Lokalisation und Palmitoylierung der Ras-Proteine in der Hefe notwendig ist (Bartels *et al.*, 1999, Lobo *et al.*, 2002, Zhao *et al.*, 2002). Hier wurde u.a. gezeigt, dass Mutationen innerhalb der DHHC-Region die Funktion des Erf2p-Proteins im Prozess der Ras-Lokalisation aufheben.

Es wird angenommen, dass die DHHC-Domäne in Protein-Protein-Interaktionen eingreift. Ob die DHHC-Domäne für die Bindung des im Laufe meiner Arbeit identifizierten r-SREC-Proteins an die E1A-Proteine von Bedeutung ist, bleibt durch Mutationsanalysen zu klären.

## **(2) Transmembran-Regionen**

Eine Anordnung von Transmembran-Regionen um die DHHC-Domäne, so wie sie aus der r-SREC Aminosäuresequenz hervorgeht, wird in einigen cytoplasmatisch lokalisierten, membrangebundenen Proteinen sowie zellulären Proteinen gefunden, die mit dem endoplasmatischen Reticulum assoziiert sind (z.B. Erf2p). Meine Untersuchungen in Immunfluoreszenz Analysen zeigten eindeutig, dass r-SREC cytoplasmatisch lokalisiert ist. Erste, weiterführende Experimente mit einem ER-spezifischen Marker zeigen darüber hinaus, dass die Lokalisation des r-SREC-Proteins weitgehend mit der Lokalisation des endoplasmatischen Reticulums übereinstimmt. Computeranalysen, mit deren Hilfe die hypothetische Lokalisation von Proteinen bestimmt werden kann, stützen die Annahme, dass r-SREC mit dem ER assoziiert vorliegt. Die Wahrscheinlichkeit hierfür wurde mit 43% angegeben.

## 5.4 Das cytoplasmatisch lokalisierte r-SREC-Protein reprimiert die Ad12 E1A<sub>13S</sub>-vermittelte Transaktivierung spezifischer Promotoren

In transienten Expressionstudien konnte ich zeigen, dass r-SREC die Ad12 E1A<sub>13S</sub>-vermittelte Transaktivierung spezifischer viraler Promotoren (E2<sub>Ad12</sub> und G5 E1B-TATA-CAT) reprimiert (siehe **Kap. 4.7**). Meine Immunfluoreszenzanalysen belegen, dass das r-SREC-Protein cytoplasmatisch lokalisiert ist (siehe **Kap. 4.8**). Anhand dieser Ergebnisse muss man davon ausgehen, dass das r-SREC-Protein seine reprimierenden Funktionen im E1A-vermittelten Transaktivierungsprozess primär im Cytoplasma und nicht im Zellkern ausübt. Es stellt sich somit die Frage, wie dieses cytoplasmatisch lokalisierte Protein in der Lage ist, die transkriptionelle Funktion der E1A-Proteine, die bisher als klassische Transkriptionsfaktoren galten, zu modulieren.

Seit Ende des Jahres 2002 ist bekannt, dass eine wenn auch geringe Fraktion der E1A-Proteine nach ihrer Synthese im Cytoplasma verbleibt (Madison *et al.*, 2002). Madison und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die cytoplasmatische Lokalisation der E1A-Proteine mit der Acetylierung eines spezifischen Lysinrestes (Lys 239) in der E1A-Polypeptidkette einhergeht. Dies lässt vermuten, dass die acetylierten E1A-Proteine spezifische Funktionen im Cytoplasma ausüben.

Diese Vermutung wird durch Daten unserer Arbeitsgruppe unterstützt, in denen der Nachweis erbracht wurde, dass das E1A<sub>12S</sub>-Protein eine wichtige cytoplasmatische Funktion ausübt, die zur Aktivierung des Zielgens führt (Fax *et al.*, 2001). Hier konnte gezeigt werden, dass das E1A<sub>12S</sub>-Protein mit den im Cytoplasma lokalisierten regulatorischen Untereinheiten (RI $\alpha$ , RII $\alpha$ ) des PKA-Holoenzym interagiert. Die perinukleär-lokalisierte regulatorische Untereinheit RII $\alpha$  wird durch die Anwesenheit des E1A<sub>12S</sub>-Proteins in den Zellkern transloziert. In transienten Expressionstudien wurde nachgewiesen, dass die Koexpression des E1A<sub>12S</sub>-Proteins und der RII $\alpha$ -Untereinheit zu einer starken Aktivierung des E2<sub>Ad12</sub>-Promotors führt.

Dies ist eines der ersten Beispiele dafür, dass E1A-Proteine mit cytoplasmatisch lokalisierten zellulären Faktoren physikalisch und funktionell interagieren können.

Ein möglicher Weg, wie das cytoplasmatisch lokalisierte r-SREC-Protein die E1A-transaktivierende Funktionen reprimiert, wird nachfolgend diskutiert. Die Hypothese beruht auf strukturellen Ähnlichkeiten des r-SREC-Proteins mit dem zellulären Protein Erf2p, einem Faktor, der in den Ras/Raf/MEK/ERK-Signaltransduktionsweg involviert ist (Bartels *et al.*, 1999, Lobo *et al.*, 2002, Zhao *et al.*, 2002).

Der Ras/Raf/MEK/ERK-Signaltransduktionsweg übermittelt Signale spezifischer Rezeptoren der Zelloberfläche an Transkriptionsfaktoren, die nachfolgend regulierend in die Genexpression eingreifen (als Übersicht siehe Chang *et al.*, 2003). Dieser Signaltransduktionsweg ist z.B. für die Zellproliferation sowie die Apoptose von großer Bedeutung. Für die Aktivierung von Raf ist dessen Rekrutierung an der Plasmamembran essentiell, die durch die Interaktion mit membran-gebundenem Ras vermittelt wird. Aktiviertes Raf induziert anschließend die MEK/ERK Signalkaskade. ERK kann danach einerseits eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-Jun, c-Myc und Ets-1, direkt phosphorylieren. Andererseits phosphoryliert und aktiviert es die sog. RSK („ribosomal S6 kinase“), die ihrerseits z.B. den Transkriptionsfaktor CREB aktiviert.

Die Inhibition der Ras-Aktivität verhindert die Aktivierung von Raf und somit die Induktion des Signaltransduktionsweges. Für die Translokation der am cytolischen endoplasmatischen Reticulum synthetisierten Ras-Proteine an die Cytoplasmamembran sind mehrere posttranslationale Modifizierungen eines carboxyterminal gelegenen Motivs der Ras-Proteine, der sog. CaaX-Box, notwendig (Zhao *et al.*, 2002). Eine dieser posttranslationalen Modifizierungen ist die Palmitoylierung. In *S. cerevisiae* konnten zwei Gene, Erf2p und Erf4p, identifiziert werden, die in die Palmitoylierung von Ras involviert sind (Bartels *et al.*, 1999, Lobo *et al.*, 2002). Erf2p und Erf4p bilden einen Komplex, der mit dem endoplasmatischen Reticulum assoziiert ist. Das Erf2p Gen kodiert für ein Protein mit vier Transmembran-Regionen und einer DHHC-Domäne und ist an der Membran des endoplasmatischen Reticulums lokalisiert. Zhao und Mitarbeiter haben gezeigt, dass sowohl die Deletion von Erf2p und/oder Erf4p als auch Mutationen innerhalb der DHHC-Domäne die Ras-Palmitoylierung inhibiert (Zhao *et al.*, 2002). Durch die fehlende Palmitoylierung wird Ras in *S. cerevisiae* nicht an die Cytoplasmamembran transloziert, wodurch eine Aktivierung von Raf sowie die nachfolgende Induktion der MEK/ERK-Kaskade inhibiert werden.

Da meine vorläufigen Experimente zeigten, dass das r-SREC-Protein im endoplasmatischen Reticulum lokalisiert ist und eine ähnliche Domänenstruktur (DHHC-

Domäne, vier Transmembran-Regionen) wie Erf2p aufweist, könnte man vermuten, dass r-SREC ebenfalls in die Palmitylierung und Translokation der Ras-Proteine an die Cytoplasmamembran involviert ist und damit in den Ras/Raf/MEK/ERK-Signaltransduktionsweg positiv regulierend eingreifen könnte.

Durch Immunfluoreszenzanalysen konnte ich zeigen, dass die Koexpression von E1A zu einer Umverteilung des r-SREC Proteins in der Zelle führt. Die Interaktion des r-SREC-Proteins, möglicherweise über die DHHC-Domäne, von der gezeigt wurde, dass sie für die Palmitylierung von Bedeutung ist, mit cytoplasmatischen E1A-Proteinen könnte r-SREC inaktivieren und den Signalweg zumindest teilweise reprimieren (negative Regulation).

Dass Adenoviren durch die Funktionen der E1A-Proteine nach Infektion der Zellen spezifische zelluläre Gene in ihrer Expression reprimieren und andere aktivieren, ist bekannt. So werden nach Adenovirusinfektion zahlreiche vorher exprimierte Gene reprimiert, um die Synthese der eigenen viralen Proteine zu gewährleisten, während Gene, deren Produkte für die Zellzyklusregulation und Proliferation notwendig sind, aktiviert werden. Durch die Interaktion von E1A mit r-SREC und die mögliche Reprimierung des Ras/Raf/MEK/ERK-Signaltransduktionsweges könnten Adenoviren spät in der viralen Entwicklungsphase die Expression spezifischer zellulärer Gene weitgehend abschalten. Dass sie dadurch, wie meine transienten Expressionstudien zeigen, die Expression der eigenen frühen viralen Promotoren ebenfalls negativ modulieren, ist spät im Infektionszyklus für die Virusentwicklung möglicherweise von untergeordneter Bedeutung. Analysen der zeitlichen Expression früher adenoviraler Gene haben gezeigt, dass die Expression dieser Gene spät im Entwicklungszyklus der Viren weitestgehend herunterreguliert wird.

Unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe geben weitere Hinweise darauf, dass cytoplasmatisch lokalisierte E1A-Proteine möglicherweise regulierend in Signaltransduktionswege eingreifen können. Hier konnten wir zeigen, dass E1A-Proteine mit dem zellulären Protein „Sprouty“, einem an der Cytoplasmamembran lokalisierten Inhibitor des Ras/Raf/MAPK-Signaltransduktionsweges (Egan *et al.*, 2002), interagieren. Diese Interaktion der E1A-Proteine mit dem Repressor „Sprouty“ könnte zu einer Aktivierung des Ras/Raf/MAPK-Signalweges führen und z.B. die Expression zellulärer Gene aktivieren, die für die Deregulation des Zellzyklus und die Proliferation benötigt werden und somit die virale Replikation positiv beeinflussen.



Bisher glaubte man, dass die E1A-Proteine der Adenoviren die Expression zellulärer Gene ausschließlich auf transkriptioneller Ebene regulieren. Die vorgestellten Daten lassen hier jedoch die Vermutung zu, dass Adenoviren zudem Wege der Regulation von Signaltransduktionswegen nutzen, um somit die Genexpression der Wirtszelle indirekt zu modulieren.

## 6 Zusammenfassung und Ausblick

Die adenoviralen E1A-Proteine sind für die Expression aller anderen viralen Gene essentiell und modulieren zudem die Expression spezifischer zellulärer Gene um eine effiziente Replikation des viralen Genoms zu gewährleisten. Dabei vermitteln sie ihre Funktionen über Protein-Protein-Interaktionen mit zellulären Proteinen, die u.a. an der Regulation des Zellzyklus, der Differenzierung und der Apoptose beteiligt sind.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit konnte ich eine Volllängen cDNA identifizieren, die für einen bisher nicht beschriebenen E1A-Proteine-bindenden, zellulären Faktor (r-SREC) mit einem offenen Leseraster von 366 Aminosäuren kodiert. Meine Experimente haben gezeigt, dass sowohl Ad12 E1A- als auch Ad2/Ad5 E1A-Proteine *in vitro* und *in vivo* effizient mit dem r-SREC-Protein interagieren. Durch *in vitro* Protein-Protein-Interaktionsstudien konnte ich die konservierte Region 2 und den N-terminalen Bereich (AS 1-79) der E1A-Proteine als die für diese Interaktion verantwortlichen Proteindomänen identifizieren. Die Expression der nativen mRNA konnte in Rattengeweben (Herz, Hirn, Lunge, Niere und Hoden) in einer Größe von 1,6 und 3,4 kb sowie in humanen Geweben (Herz, Hirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere und Pankreas) in einer Größe von 4,4 kb nachgewiesen werden.

Weiterführende Experimente zeigten, dass das r-SREC-Protein in der Zelle sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit der E1A-Proteine cytoplasmatisch lokalisiert ist. Hier konnte jedoch beobachtet werden, dass die Koexpression der E1A-Proteine zu einer erhöhten Konzentration des r-SREC-Proteins in einem distinkten Bereich an der Kernmembran führt. Meine Daten belegen weiterhin, dass r-SREC in transienten Expressionsstudien trotz seiner cytoplasmatischen Lokalisation die E1A<sub>13S</sub>-vermittelte Aktivierung der viralen Promotoren E2<sub>Ad12</sub> und G5-E1B TATA reprimiert.

Zukünftig soll durch den Einsatz von r-SREC-Proteinmutanten die für die Interaktion mit den E1A-Proteinen verantwortliche Proteindomäne identifiziert werden. Weiterhin sollen diese Mutanten bezüglich einer möglichen Veränderung ihrer zellulären Lokalisation untersucht werden. Ein weiteres Ziel der fortführenden Arbeiten ist es zelluläre Interaktionspartner von r-SREC zu identifizieren.

Ein wichtiges Ziel ist die Aufklärung der Mechanismen, die zur Reprimierung im E1A-vermittelten Transaktivierungsprozess durch das r-SREC-Protein führen. Solche Untersuchungen könnten zum Verständnis der möglichen Funktionen cytoplasmatisch lokalisierter E1A-Proteine im Prozess der Regulation der Signaltransduktionswege beitragen.

## 7. Literaturverzeichnis

**Anbazhagan, R., Fujii, H. und Gabrielson, E. (1998):** Allelic loss of chromosomal arm 8p in breast cancer progression. *Americ. J. Pathol.* **152**: 815-819.

**Adams, P. D. und Kaelin, W. G. (1998):** Negative control elements of the cell cycle in human tumors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 791-797.

**Angel, P. und Karin, M. (1991):** The role of Jun, Fos and AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochem. Biophys. Acta* **1072**: 129-157.

**Aronheim, A. (1997):** Improved efficiency Sos recruitment system: expression of the mammalian GAP reduces isolation of Ras GTPase false positives. *Nucl. Acids Res.* **25**: 3373-3374.

**Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S. J. und Karin, M. (1997):** Isolation of an AP-1 Repressor by a Novel Method for Detecting Protein-Protein Interactions. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 3094-3102.

**Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R., et al., eds. (1997):** Current protocols in molecular biology. New York: Wiley

**Avantaggiati, M. L., Okryzko, V. V., Gardner, K., Giordano, A., Levine, A. S. und Kelly, K. (1997):** Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell* **89**: 1175-1184.

**Bailey, A. und Mautner, V. (1994):** Phylogenetic relationships among adenovirus serotypes. *Virology* **205**: 438-452.

**Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., vanTuinen, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y. (1989):** Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* **244**: 217-221.

**Bartels, D. J., Mitchell, D. A., Dong, X. und Deschenes, J. (1999):** Erf2, a novel gene product that affects the localization and palmitoylation of Ras2 in *saccharomyces cerevisiae*. *M. cell. biol.* **19**: 6775-6787.

**Berk, A. J. (1986):** Adenovirus promoters and E1A transactivation. *Ann. Rev. Genet.* **20**: 45-79.

**Bernards, R., Schrier, P. I., Houweling, A., Bos, J. L., van der Eb, A. J., Zylstra, M. und Melief, C. J. M. (1983):** Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity. *Nature* **305**: 776-797.

**Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979):** A rapid alkine extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.

**Bova, G., Carter, B. S., Bussemakers, M., Emi, M., Fujiwara, Y., Kyprianou, N., Jacobs, S. C., Robinson, J. C., Epstein, J., Walsh, P. C. und Isaacs, W. B. (1993):** Homozygous deletion and frequent allelic loss of chromosome 8p22 loci in human prostate cancer. *Cancer Res.* **53**: 3869-3873.

**Boyer, T. G., Martin, M. E., Lees E., Ricciardi, R. P. und Berk, A. J. (1999):** Mammalian Srb/Mediator complex is targeted by adenovirus E1A protein. *Nature* **399**: 276-279.

- Bradford, M. M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brockmann, D., Tries, B. und Esche, H. (1990):** Isolation and characterisation of novel adenovirus type 12 E1A mRNAs by cDNA cloning. *Virology* **179**: 585-590.
- Brockmann, D. und Esche, H. (1995):** Regulation of viral and cellular gene expression by E1A proteins encoded by the oncogenic adenovirus type 12. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199**: 81-112.
- Brockmann, D., Fax, P., Hashemi, R., Kullmann, S., Lehmkuhler, O., Nolte, C. und Esche, H. (2001):** Adenovirus E1A: a functional link between transcription factors and co-activators. *Recent Res. Devel. Virol.* **3**: 277-295.
- Brockmann, D., Schäfer, D., Kirch, H. C. und Esche, H. (1996):** Repression of c-Jun-induced mouse major histocompatibility class I promoter (H-2K<sup>b</sup>) activity by the adenovirus type 12-unique 52R E1A protein. *Oncogene* **12**: 1715-1725.
- Broker, T. R., Keller, C. C. und Roberts, R. J. (1984):** Human adenovirus serotypes 2, 4, 8, 40 and 41 and adenovirus-simian virus 40 hybrids. In: *Genetic maps*, Vol. 3 (O' Brian, S. J., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 99-110.
- Burgert, H. G., Maryanaska, J. L. und Kvist, S. (1987):** „E3/19K“ protein of adenovirus type 2 inhibits lysis of cytotoxic T lymphocytes by blocking cell-surface expression of histocompatibility class I antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 1356-1360.
- Byrd, P. J., Grand, R. J. und Gallimore, P. H. (1988):** Differential transformation of primary human embryo retinal cells by adenovirus E1 regions and combinations of E1A + ras. *Oncogene* **2**: 477-484.
- Chang, F., Steelman, L. S., Lee, J. T., Shelton, J. G., Navolanic, P. M., Blalock, W. L., Franklin, R. A. und McCurey, J. A. (2003):** Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential target for therapeutic intervention. *Leukemia* **17**: 1263-1293.
- Chevray, P. M. und Nathans, D. (1992):** Protein cloning in yeast: Identification of mammalian proteins that react with leucine zipper of Jun. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5789-5793.
- Cohen, C. J., Shieh, J. T. C., Pickles, R. J., Okegawa, T., Hsieh, J. T. und Bergelson J. M. (2001):** The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 15191-15196.
- Cullan, B. R. (2001):** Journey to the center of the cell. *Cell* **105**: 697-700.
- Doerfler, W. (1969):** Nonproductive infection of baby hamster kidney cells (BHK21) with adenovirus type 12. *Virology* **38**: 587-606.
- Duyndam, M., van Dam, H., van der Eb, A. und Zantema, A. (1996):** The CR1 and CR3 domains of Adenovirus Type 5 E1A proteins can independently mediate activation of ATF-2. *J. Virol.* **70**: 5852-5859.

- Eckner, R., Ewen, M. E., Newsome, D., Gerdes, M., DeCaprio, J. A., Lawrence, J. B. und Livingston, D. M. (1994):** Molecular cloning and functional analysis of the Adenovirus E1A-associated 300-kD protein (p300) reveals a protein with properties of a transcriptional adaptor. *Genes Dev.* **8**: 869-884.
- Egan, J. E., Hall, A. B., Yatsula, B. A. und Bar-Sagi, D. (2002):** The bimodal regulation of epidermal growth signaling by human Sprouty proteins. *PNAS* **99**: 6041-6046.
- Esche, H., Schilling, R. und Doerfler, W. (1979):** In vitro translation of adenovirus type 12-specific mRNA isolated from infected and transformed cells. *J. Virol.* **30**: 21-31.
- Esche, H. und Siegmann, B. (1982):** Expression of early viral gene products in adenovirus type 12 infected and transformed cells. *J. Virol.* **60**: 99-113.
- Evans, R. M., Fraser, N., Ziff, E., Weber, J., Wilson, M. und Darnell, J. E. (1977):** The initiator sites for RNA transcription in Ad2 DNA. *Cell* **12**: 733-739
- Fax, P., Lipinski, K. S., Esche, H. und Brockmann, D. (2000):** cAMP-independent activation of the Adenovirus type 12 E2 promoter correlates with the recruitment of CREB-1/ATF-1, E1A<sub>12S</sub>, and CBP to the E2-CRE. *J. Biol. Chem.* **275**: 8911-8920.
- Fax, P., Carlson, C. R., Collas, P., Tasken, K., Esche, H. und Brockmann, D. (2001):** Binding of PKA-RII $\alpha$  to the adenovirus E1A<sub>12S</sub> oncoprotein correlates with its nuclear translocation and increase in PKA-dependent promoter activity. *Virology* **285**: 30-41.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B. (1983):** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13.
- Ferguson, B., Kriipple, B., Andrisani, O., Jones, N., Westphal, H. und Rosenberg, M. (1985):** E1A 13S and 12S mRNA products made in *Escherichia coli* both function as nucleus-localized transcription activators but do not directly bind DNA. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 2653-2661.
- Flint, J. und Broker, T. R. (1981):** Lytic infection by adenoviruses. In: *Molecular Biology of Tumor Viruses* (Tooze, J., ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 443-547.
- Friend, S. H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Alber, D. M. Dryja, T. P. (1986):** A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**: 643-646.
- Fujiwara, Y., Ohata, H., Kuroki, T., Koyama, K., Tsuchiya, E., Monden, M. und Nakamura, Y. (1995):** Isolation of a candidate tumor suppressor gene on chromosome 8p21.3-p22 that is homologous to an extracellular domain of the PDGF receptor beta gene. *Oncogene* **10**: 891-895.
- Gabler, S., Schütt, H., Groitl, P., Wolf, H., Shenk, T. und Dobner, T. (1998):** E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J. Virol.* **72**: 7960-7971.
- Gallimore, P. H. und Turnell, A. S. (2001):** Adenovirus E1A: remodelling the host cell, a life or death experience. *Oncogene* **20**: 7824-7835.

- Gooding, L. R., Elmore, L. F., Tollefson, A. E., Brody, H. A. und Wold, W. S. M. (1988):** A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell* **53**: 341-346.
- Greber, U. F., Suomalainen, M., Stidwill, R. P., Boucke, K., Ebersold, M. W. und Helenius, A. (1997):** The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J.* **16**: 5998-6007.
- Gu, W., Shi, X. L. und Roeder, R. G. (1997):** Synergistic activation of transcription by CBP and p53. *Nature* **387**: 819-823.
- Horwitz, M. S., Scharff, M. D. und Maizel, J. V. (1969):** Synthesis and assembly of adenovirus 2. I. Polypeptide synthesis, assembly of capsomeres and morphogenesis of the virion. *Virology* **39**: 682-684.
- Horwitz, M. S. (1990):** Adenovirus. In: *Virology* (Fields, B. N. und Knipe, D. M., eds.), Raven Press, New York, pp. 1723-1740.
- Houweling, A., van den Elsen, P. J. und van der Eb, A. J. (1980):** Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4,5 % fragment of adenovirus 5 DNA. *Virology* **105**: 537-550.
- Ikeda, M. A. und Nevins, J. R. (1993):** Identification of distinct roles for separate E1A domains in disruption of E2F complexes. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7029-7035.
- Janknecht, R. und Hunter, T. (1996):** A growing coactivator network. *Nature* **383**: 22-23.
- Jelinek, T., Pereira, D. S. und Graham, F. L. (1994):** Tumorigenicity of adenovirus-transformed rodent cells is influenced by at least two regions of adenovirus early region 1A. *J. Virol.* **68**: 888-896.
- Jochimsen, H., Daniels, G. S. G., Hertoghs, J. J. L., Schrier, P. I., van den Elsen, P. J. und van der Eb, A. J. (1982):** Identification of adenovirus-type 12 gene products involved in transformation and oncogenesis. *Virology* **122**: 15-28.
- Kimelmann, D., Miller, J., Porter, D. und Roberts, B. (1985):** E1A regions of human adenoviruses and the highly oncogenic simian virus 7 are closely related. *J. Virol.* **53**: 399-409.
- Klebe, R. J., Harriss, J. V., Sharp, Z. D. und Douglas, M. G. (1983):** A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* **25**: 333-341.
- Kozak, M. (1996):** Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mam. Gen.* **7**: 563-574.
- Laemmli, U. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lill, N., Grossmann, S. R., Ginsberg, D., DeCaprio, J. und Livingston, D. M. (1997):** Binding and modulation of p53 by p300/CBP coactivators. *Nature* **387**: 823-827.
- Lillie, J. W., Green, M., und Green, M. R. (1986):** An adenovirus E1A protein region required for transformation and transcriptional repression. *Cell* **46**: 1043-1051.

- Lipinski, K. S., Fax, P., Wilker, B., Hennemann, H., Brockmann, D. und Esche, H. (1999):** Differences in the interactions of oncogenic adenovirus 12 early region 1A and nononcogenic adenovirus 2 early region 1A with the cellular coactivators p300 and CBP. *Virology* **255**: 94-105.
- Lipinski, K. S., Esche, H., und Brockmann, D. (1998):** Amino acids 1-79 of the adenovirus serotypes 12 and 2 E1A proteins interact with rap30 (TF(II)F) and TBP in vitro. *Virus Res.* **54**: 99-106
- Lipinski, K. S., Kröner-Lux, G., Esche, H., und Brockmann, D. (1997):** The E1A N-terminus of the highly-oncogenic adenovirus type 12 harbors a *trans*-activation function not detectable in the non-oncogenic serotype 2. *J. Gen. Virol.* **78**: 413-421.
- Liu, F., und Green, M. R. (1990):** A specific member of the ATF transcription factor family can mediate transcription activation by adenovirus E1A protein. *Cell* **61**: 1217-1224.
- Londberg-Holm, K. und Philipson, L. (1969):** Early events of virus-cell interactions in an adenovirus system. *J. Virol.* **4**: 323-338
- Madison, D. L., Yaciuk, P., Kwok, R. P., Lundblad, J. R. (2002):** Acetylation of adenovirus-transforming protein E1A determines nuclear localization by disrupting association with importin- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* **277**(41): 38755-38763.
- Mazzarelli, J. M., Mengus, G., Davidson, I., Ricciardi, R. (1997):** The transactivation domain of adenovirus E1A interacts with the C terminus of human TAF<sub>II</sub>135. *J. Virol.* **71**: 7978-7983
- Moran, E. (1994):** Mammalian cell growth controls reflected through protein interactions with the adenovirus E1A gene products. *Semin. Virol.* **5**: 327-340.
- Mullis, K., Falcoona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Ehrlich, H. (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Nevins, J. und Darnell, J. E. (1978):** Groups of adenovirus type 2 mRNAs derived from large primary transcript: probably nuclear origin and possible common 3'-ends. *J. Virol.* **25**: 811-823.
- Norrby, E., Bartha, A. und Boulanger, P. (1976):** Adenoviridae. *Intervirology* **7**: 117-125.
- Oyama, T., Miyoshi, Y., Koyama, K., Nakagawa, H., Yamori, T., Ito, T., Matsuda, H., Arakawa, H. und Nakamura, Y. (2000):** Isolation of a novel gene on 8p21.3-22 whose expression is reduced significantly in human colorectal cancers with liver metastasis. *Genes, Chromosomes and Cancer* **29**: 9-15.
- Pastan, I., Seth, P., Fitzgerald, D. und Willingham, M. (1987):** Adenovirus entry into cells: some new observations on an old problem. In: *Concepts in viral pathogenesis* (Notkins, A. und Oldstone M. B. A., eds.), Springer Verlag, New York, pp. 141-146.
- Pavletich, N. P. und Pabo, C. O. (1991):** Crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1Å. *Science* **252**: 809-817.
- Philipson, L. (1983):** Structure and assembly of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **109**: 1-53.

- Pilder, S., Moore, M., Logan, J. und Shenk, T. (1986):** The adenovirus E1B-55K transforming polypeptide modulates transport or cytoplasmatic stabilisation of viral and host cell mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 470-476.
- Putilina, T., Wong, P. und Gentleman, S. (1999):** The DHHC domain: A new highly conserved cysteine-rich motif. *Mol. Cell. Biochem.* **195**: 219-226.
- Rowe, W. P., Heubner, R. J., Gallimore, L. K., Parrot, R. H. und Ward, T. G. (1953):** Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.* **84**: 570-573.
- Roelvink, P. W., Lizonova, A., Lee, J. G. M., Li, Y., Bergelson, J. M., Finberg, R. W., Brough, D. E., Kovesdi, I. und Wickham, T. J. (1998):** The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J. Virol.* **72**: 7909-7915.
- Ruley, H.E. (1983):** Adenovirus early region 1 A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* **304**: 602-606.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989):** *Molecular cloning: a laboratory manual, second edition*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schiestl, R. H. und Gietz, R. D. (1989):** High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**: 339-346.
- Shenk, T. (1996):** Adenoviridae: the viruses and their replication. In: *Fundamental Virology*, Third Edition, (Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. *et al.*, eds.), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, USA.
- Slansky, J. E. und Farnham, P. J. (1996):** Introduction to the E2F family: Protein structure and gene regulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **208**: 13-30.
- Smith, D. und Johnson, K. (1988):** Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**: 31-40.
- Smits, P. H. M., de Wit, L., van der Eb, A. J. und Zantema, A. (1996):** The adenovirus E1A-associated 300 kDa adaptor protein counteracts the inhibition of the collagenase promoter by E1A and represses transformation. *Oncogene* **12**: 1529-1535.
- Stephens, C. und Harlow, E. (1987):** Differential splicing yields novel adenovirus 5 E1A mRNA that encode 30 kd and 35 kd proteins. *EMBO J.* **6**: 2027-2035.
- Sussenbach, J. S. und van der Vliet, P. C. (1983):** The mechanism of adenovirus DNA replication and the characterization of replication proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **109**: 53-75.
- Telling, G. C. und Williams, J. (1994):** Constructing chimeric type 12/type5 adenovirus E1A genes and using them to identify an oncogenic determinant of adenovirus type 12. *J. Virol.* **68**: 877-887.
- Tooze, J. (1981):** Molecular biology of tumor viruses - part 2, DNA tumor viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA.



- Ulfendahl, P. J., Linder, S., Kreivi, J.-P., Nordquist, K., Svensson, C., Hultberg, H. und Akusjärvi, G. (1987):** A novel adenovirus 2 E1A mRNA encoding a protein with transcription activation properties. *EMBO J.* **6**: 2037-2044.
- van den Elsen, P. J., Houweling, A. und van der Eb, A. J. (1983):** Morphological transformation of human adenovirus is determined to a large extent by gene products of region E1A. *Virology* **131**: 242-246.
- van der Eb, A. J. und Bernards, R. (1984):** Transformation and oncogenicity by adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **110**: 23-51.
- Wadell, G. (1984):** Molecular epidemiology of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **110**: 191-220.
- Wang, H. G. H., Yaciuk, P., Ricciardi, R. P., Green, M., Yokoyama, K. und Moran, E. (1993):** The E1A products of oncogenic adenovirus serotype 12 include an amino-terminally modified form able to bind the retinoblastoma protein but not p300. *J. Virol.* **67**: 4804-4813.
- Watson, J., Hopkins, N., Roberts, J., Steitz, J. und Weitner, A. (1987):** Molecular biology of the gene. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Melo Park, California, USA.
- White, E. (1995):** Regulation of p53-dependent apoptosis by E1A and E1B. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199/III**: 33-59.
- Whyte, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A. und Harlow, E. (1988A):** Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* **334**: 124-129.
- Whyte, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A. und Harlow, E. (1988):** Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature (London)* **334**: 124-129.
- Williams, J., Williams, M., Liu, C. und Telling, G. (1995):** Assessing the role of E1A in the differential oncogenicity of group A and group C human adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **199/III**: 149-177.
- Zhang, H. S., Mak, S. und Branton, P. E. (1995):** Adenovirus type 12 early region 1 B proteins and metabolism of viral mRNAs. *Virology* **191**: 793-802.
- Zhang, H. S., und Dean, D. C. (2001):** Rb-mediated structure regulation and transcriptional repression. *Oncogene* **20**: 3134-3138.
- Zhao, L., Lobo, S., Dong, X., Ault, A. D., und Deschenes, R. (2002):** Erf2p and Erf4p form an endoplasmic reticulum-associated complex involved in the plasma membrane localization of Ras proteins. *J. Biol. Chem.* **277**: 49352-49359.
- Zu, Y. L., Takamatsu, Y., Zhao, M. J., Maekawa, T., Handa, H., Ishii, S., (1992):** Transcriptional regulation by a point mutant of adenovirus-2 E1A product lacking DNA binding activity. *J. Biol. Chem.* **267**: 20161-20187.

## 8. Publikationen

**Brockmann, D., Fax. P., Hashemi, R., Kullmann, S., Lehmkuhler, O., Nolte, C. und Esche, H. (2001):** Adenovirus E1A: a functional link between transcription factors and co-activators. *Recent Res. Devel. Virol.* **3**: 277-295.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name	Silke Kullmann
Anschrift	Uhlandstr. 2B, 45219 Essen, (02054)124837
Geburtsdatum	09.03.1971
Geburtsort	Essen
Familienstand	ledig

### Schulausbildung

---

1977-1981	Wilhelm-Busch-Grundschule, Ratingen
1981-1987	Städtische Realschule, Heiligenhaus <b>Abschluss: Fachoberschulreife</b>
1987-1990	Gymnasium Marienschule, Essen <b>Abschluss: Allgemeine Hochschulreife</b>

### Hochschulausbildung

---

10/1990-08/1994	Studium der Chemie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
09/1994-11/1999	Studium des Chemieingenieurwesens, Studienschwerpunkt Biochemie/Biotechnologie, an der Fachhochschule Niederrhein, Krefeld Diplomarbeit am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung) zum Thema „Identifikation Adenovirus- Serotyp 12 E1A-CR2-S-CR3 bindender, zellulärer Faktoren mit Hilfe des Hefe SOS-Two-Hybrid-Systems“, Universitätsklinikum Essen <b>Abschluss: Diplom-Ingenieur</b>
seit November 1999	Promotion am Institut für Molekularbiologie (Tumorforschung), Universitätsklinikum Essen

## 10. Erklärungen

### Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 7:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Identifikation und Charakterisierung des Adenovirus E1A-Proteine bindenden zellulären Faktors r-SREC“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Silke Kullmann befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_  
(Prof. Dr. H. Esche)

### Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 6:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den \_\_\_\_\_  
(Silke Kullmann)

### Erklärung zu § 6, Abs. 2, Nr. 8:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6, Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den \_\_\_\_\_  
(Silke Kullmann)

## **Danksagungen**

Sehr herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Esche, dass er mir die Möglichkeit gab diese Arbeit in seinem Institut durchführen zu können sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft und die wertvollen wissenschaftlichen Anregungen.

Danken möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. D. Brockmann für die intensive wissenschaftliche Betreuung während seiner Zeit am Institut.

Meinen ehemaligen und jetzigen Laborkollegen Frau Dr. Alexandra Dickopp, Herrn Dr. Peter Fax, Herrn Dr. Oliver Lehmkuhler und Frau Dipl. Biol. Bettina Gunawardena danke ich für das nette Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft in allen Situationen des Laboralltags.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dipl. Biol. Rozita Hashemi und Frau Dipl. Biol. Katja Schoppmeyer für die freundschaftliche Unterstützung sowie die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ganz lieben Dank an Frau Ursula Schmücker und Frau Claudine Kühn für die gute Kooperation bei der Durchführung meiner Experimente.

Dr. Ulrich Frey danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Herzlich danken möchte ich Herrn Mathias Faas, der mir nicht nur geholfen hat alle Tücken des Computers zu überwinden, sondern mir in der letzten Zeit auch ein besonders lieber Beistand war.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern, die mir ermöglicht haben diesen Weg zu gehen und mich jederzeit liebevoll unterstützt haben.